

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zur Diagnostik und zum Vorkommen von  
*Toxoplasma gondii* als Aborterreger beim Schaf in Nordbayern  
mit differentialdiagnostischer Berücksichtigung von *Neospora caninum***

von Nicola Meixner  
aus Bad Windsheim

München 2021



Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:  
Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und  
Lebensmittelsicherheit in Erlangen

Mentor: Dr. Matthias Müller



**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Markus Meißner

Tag der Promotion: 6. Februar 2021



*Für meine Eltern*





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b><i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	<b>3</b>
1.1.	Historische Übersicht und Taxonomie.....	3
1.2.	Morphologie .....	5
1.3.	Entwicklungszyklus .....	7
1.4.	Zoonotisches Potential .....	9
<b>2.</b>	<b>Ovine Toxoplasmose</b> .....	<b>11</b>
2.1.	Epidemiologie.....	11
2.2.	Pathogenese, Klinik und Pathologie .....	15
2.3.	Bekämpfung und Prophylaxe.....	17
<b>3.</b>	<b>Diagnostik der Toxoplasmose</b> .....	<b>17</b>
3.1.	Direkte Nachweismethoden .....	17
3.1.1.	Erregerisolierung .....	17
3.1.2.	Mikroskopischer Erregernachweis und histologische Untersuchung .....	18
3.1.3.	Immunhistochemie.....	18
3.1.4.	In-situ-Hybridisierung .....	20
3.1.5.	Polymerase-Kettenreaktion.....	21
3.2.	Indirekte Nachweismethoden.....	22
<b>4.</b>	<b><i>Neospora caninum</i> als differentialdiagnostischer Aborterreger beim Schaf</b> .....	<b>23</b>
<b>III.</b>	<b>PUBLIKATION</b> .....	<b>27</b>
<b>IV.</b>	<b>WEITERE ERGEBNISSE</b> .....	<b>53</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>57</b>
<b>1.</b>	<b>Vorkommen von <i>T. gondii</i> bei Schafaborten im Einsendungsgut aus Nordbayern</b> .....	<b>57</b>
<b>2.</b>	<b>Überlegungen zur Pathomorphologie der <i>T. gondii</i>-positiven Fälle</b> ....	<b>59</b>
<b>3.</b>	<b>Vergleichende Betrachtung der Nachweismethoden</b> .....	<b>60</b>
3.1.	Histopathologie .....	60
3.2.	Immunhistochemie.....	62

3.3.	In-situ-Hybridisierung .....	65
3.4.	Polymerase-Kettenreaktion.....	69
4.	<b>Nachweis von <i>N. caninum</i> bei den eingesandten Schafaborten .....</b>	<b>71</b>
5.	<b>Empfehlungen für den Nachweis von <i>T. gondii</i> als Aborterreger beim Schaf in der Routinediagnostik .....</b>	<b>73</b>
6.	<b>Ausblick .....</b>	<b>75</b>
VI.	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>77</b>
VII.	<b>SUMMARY .....</b>	<b>79</b>
VIII.	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>81</b>
IX.	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>109</b>
X.	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>
XI.	<b>ANHANG .....</b>	<b>113</b>
1.	<b>Methoden .....</b>	<b>113</b>
1.1.	Herstellung von Gewebeschnitten.....	113
1.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	114
1.3.	Immunhistochemie.....	115
1.4.	In-situ-Hybridisierung .....	116
1.5.	Real-time PCR .....	117
2.	<b>Materialien .....</b>	<b>119</b>
2.1.	Verwendete Chemikalien.....	119
2.1.1.	Chemikalien.....	119
2.1.2.	Kits .....	121
2.1.3.	Antikörper.....	121
2.1.4.	Oligonucleotide.....	121
2.2.	Verwendete Puffer und Lösungen.....	122
2.3.	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	123
2.4.	Verwendete Software.....	125
3.	<b>Alignment der zu den <i>T. gondii</i>-ISH-Sonden komplementären rRNA-Gensequenzen nahe verwandter zystenbildender Kokzidien .</b>	<b>126</b>
XII.	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>127</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AP	alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BHQ1	Black Hole Quencher 1
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CI	Konfidenzintervall
Ct	Cycle Threshold
DEPC	Diehtyldicarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Deoxynucleosidtriphosphate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
Fab	Fragment antigen binding (Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers)
FAM	6-Carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
FFPE	formalin-fixiert, paraffin-eingebettet
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
g	Gramm
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HEX	5-Hexachloro-Fluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
IC	interne Kontrolle
IFAT	indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest
IHC	Immunhistochemie ( $\triangleq$ Immunhistologie)
IHT	indirekter Hämagglutinationstest
ISH	(chromogene) In-situ-Hybridisierung
ITS	internal transcribed spacer
LAT	Latex-Agglutinationstest
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	molar
MAT	modifizierter Agglutinationstest
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
<i>N.</i>	<i>Neospora</i>
NaCl	Natriumchlorid
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
p. i.	post infectionem
pAk	polyklonaler Antikörper
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PAS	Periodic-Acid-Schiff
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RE	repeat element
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
sec	Sekunden
spp.	species pluralis
SSC	saline sodium citrate (Salzlösung Natriumcitrat)
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
subsp.	Subspezies
<i>T.</i>	<i>Toxoplasma</i>
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine
TE	Tris-EDTA [Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Ethylendiamintetraacetat]
TRIS/Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
u. a.	unter anderem
USA	United States of America (Vereinigten Staaten von Amerika)
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
ZNS	Zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

## I. EINLEITUNG

*Toxoplasma (T.) gondii* ist ein weltweit auftretender, einzelliger Parasit, der mutmaßlich alle warmblütigen Tiere infizieren kann, darunter auch den Menschen (Dubey, 2010d; Tenter et al., 2000). In den 1950er Jahren wurde der Einzeller erstmals als Aborterreger bei Schafen in Neuseeland beschrieben (Hartley et al., 1954; Hartley und Marshall, 1957). Mittlerweile gilt der Erreger als eine der Hauptursachen für infektiöse Abortgeschehen bei Schafen in Ländern wie Neuseeland, Australien, dem Vereinigten Königreich, Norwegen und den Vereinigten Staaten von Amerika (Dubey, 2010c). Über das Vorkommen von *T. gondii* als Aborterreger bei Schafen gibt es in Deutschland und insbesondere auch in Bayern bisher nur wenige Daten. Studien zum Vorkommen infektiöser Abortursachen beim Schaf in Nordbayern (Drdlicek, 2009; Plagemann, 1989) gehen auf diesen Erreger nicht näher ein. Aus diesem Grund entstand die Idee, diese Lücke für den nordbayerischen Raum zu schließen.

Als obligat intrazellulärer Parasit lässt sich *T. gondii* im Gegensatz zu den meisten bakteriellen Aborterregern nicht auf Nährböden kultivieren. Daher erfolgte, gerade in früheren Jahren, die Ermittlung einer Beteiligung von *T. gondii* am Abortgeschehen meist anhand indirekter (serologischer) Nachweisverfahren, zum Teil in Kombination mit entsprechenden histologischen Befunden (Dubey und Kirkbride, 1990; Dubey et al., 1990; Kirkbride, 1993). Charakteristische Veränderungen im fetalen Gehirn und/oder der Eihaut, können einen Hinweis auf ein *Toxoplasma*-induziertes Abortgeschehen geben (Dubey, 2010c). Mehrere Studien beschreiben jedoch die hohe Ähnlichkeit *T. gondii*-induzierter Läsionen mit denen von *Neospora (N.) caninum*, einem nahe verwandten Erreger, der in erster Linie für die Beteiligung an Rinderaborten bekannt ist. Aus diesem Grund bedarf es spezifischer Nachweismethoden zur Differenzierung der beiden einzelligen Parasiten (Buxton et al., 1997; Buxton et al., 1998; Dubey und Lindsay, 1990; McAllister et al., 1996a; Moreno et al., 2012).

Neben der Histopathologie stehen heutzutage weitere direkte Nachweisverfahren, wie die Immunhistochemie (IHC) oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), für die Detektion von *T. gondii* in ovinem Abortmaterial zur Verfügung (Borel et al., 2014; Moeller, 2012). Die chromogene In-situ-Hybridisierung (ISH), die sich in den letzten

Jahren auch zunehmend in der veterinärpathologischen Diagnostik etabliert hat, ermöglicht es, die Erreger ähnlich wie bei der IHC direkt in den pathologischen Gewebeeränderungen nachzuweisen (Mostegl et al., 2011). Leider wird die ISH bisher jedoch nicht in der Routinediagnostik zum Nachweis von *T. gondii* bei Schafaborten angewendet.

IHC und ISH eignen sich besonders für den Nachweis auf formalin-fixiertem, paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe und eröffnen so die Möglichkeit umfangreiches Archivmaterial, in diesem Fall der Veterinärpathologie des LGL Erlangen, retrospektiv zu untersuchen.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit sind daher:

1. Die Ermittlung des Vorkommens von *T. gondii* bei Schafaborten im Untersuchungsgut der Veterinärpathologie des LGL Erlangen aus den Jahren 2003 bis 2018 (Einzugsgebiet vorwiegend nordbayerischer Raum).
2. Die Etablierung eines ISH-Protokolls zum Nachweis von *T. gondii*. Darüber hinaus soll anhand eines Methodenvergleichs (Histopathologie, IHC, ISH und real-time PCR) die optimale Methode bzw. Methodenkombination zum Nachweis von *T. gondii* bei Schafaborten im Rahmen von Sektionen gefunden werden.
3. Die Bestimmung der Häufigkeit von *N. caninum* als Differentialdiagnose zu *T. gondii* im Sektionsgut aus dem oben genannten Untersuchungszeitraum.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. *Toxoplasma gondii*

#### 1.1. Historische Übersicht und Taxonomie

Die erste detaillierte Beschreibung asexueller *T. gondii*-Stadien (Tachyzoiten) veröffentlichten Nicolle und Manceaux (1908), die den Erreger im Gundi (*Ctenodactylus gundii*), einem nordafrikanischen Nagetier entdeckt hatten, im Jahr 1908. Aufgrund seines morphologischen Erscheinungsbildes etablierten sie für den Einzeller das Genus *Toxoplasma* (nach den griechischen Worten *toxon* = Bogen, *plasma* = Gebilde) und benannten die Art nach dem ursprünglichen Wirt als *Toxoplasma gondii* (Nicolle und Manceaux, 1909). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden Toxoplasmen in verschiedenen weiteren Wirten entdeckt und entsprechend der Wirtsspezies benannt (Ashburn, 1992; Levine, 1977; Tenter et al., 2000; Tenter und Johnson, 1997). Wolf et al. (1939) isolierten *Toxoplasma* auch erstmals als Ursache einer humanen Enzephalomyelitis aus dem Gewebe eines neugeborenen Kindes und benannten die Art zunächst als *Toxoplasma hominis*. Im Jahr 1939 erbrachte Sabin (1939) jedoch den Nachweis, dass eine Mehrheit der Isolate, tierischen sowie humanen Ursprungs, identisch mit *T. gondii* waren. Die genaue taxonomische Zugehörigkeit des Genus *Toxoplasma* blieb zunächst ungewiss (Levine, 1961; Tenter et al., 2000; Tenter und Johnson, 1997).

Erst Mitte der 1960er Jahre lieferten elektronenmikroskopische Vergleichsuntersuchungen von *T. gondii* Tachyzoiten und *Eimeria* Merozoiten einen Hinweis für die Zugehörigkeit des Parasiten zu den Kokzidien (Scholtyseck und Piekarski, 1965). Im gleichen Jahr wies Hutchison (1965) die Ansteckung von Mäusen mittels Kot experimentell infizierter Katzen nach und stellte die Hypothese auf, dass infektiöse, umweltresistente Stadien des Parasiten über Katzen in die Umwelt ausgeschieden werden. Bis zu diesem Zeitpunkt war neben der kongenitalen (vertikalen) Übertragung des Erregers (Wolf et al., 1939) nur eine Übertragung durch den Verzehr rohen oder unzureichend gegarten, Gewebezysten enthaltenden Fleisches nachgewiesen worden (Desmonts et al., 1965; Jacobs et al., 1960; Weinman und Chandler, 1954). Der Entwicklungszyklus von *T. gondii* wurde schließlich um 1970 durch die Entdeckung sexueller Entwicklungsstadien im Dünndarm infizierter Katzen und der daraus hervorgehenden Oozysten vollständig aufgeklärt (Dubey et al., 1970a;

Dubey et al., 1970b; Frenkel et al., 1970; Hutchison et al., 1969; Hutchison et al., 1970; Hutchison et al., 1971; Sheffield und Melton, 1970).

*Toxoplasma* gehört damit zu den zystenbildenden Kokzidien, über deren Zuordnung zur Unterordnung Eimeriorina im Phylum Apicomplexa heutzutage weitgehend Einigkeit herrscht (Abbildung 1). Die Zuordnung der Gattung zu einer bestimmten Familie wurde in der Vergangenheit jedoch zum Teil kontrovers diskutiert. Neben den ursprünglichen phänotypischen Kriterien wie Morphologie und Entwicklungszyklus gewinnen auch bei der systematischen Einteilung von einzelligen Parasiten zunehmend molekular-phylogenetische Aspekte an Bedeutung (Adl et al., 2012; Tenter et al., 2002; Tenter und Johnson, 1997).

**Phylum** Apicomplexa (Levine, 1970 emend. Adl et al., 2005)

**Subphylum** Conoidasida (Levine, 1988)

**Klasse** Coccidia (Leuckart, 1879)

**Ordnung** Eucoccidiorida (Léger und Duboscq, 1910)

**Unterordnung** Eimeriorina (Léger, 1911)

**Familie** Sarcocystidae (Poche, 1913)

**Gattung** *Toxoplasma* (Nicolle und Manceaux, 1909)

**Abbildung 1: Taxonomische Einordnung von *Toxoplasma*** (modifiziert nach Votýpka et al., 2016)

Mittlerweile wurden verschiedene Protozoen, die in den ersten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts der Gattung *Toxoplasma* zugerechnet wurden, entweder der Art *T. gondii* oder anderen Gattungen zugeordnet (Ashburn, 1992; Levine, 1977; Levine, 1988; Tenter et al., 2000; Tenter und Johnson, 1997). *T. gondii* ist somit die einzige Art seiner Gattung (Dubey, 2010a).

Obwohl *T. gondii* die einzige Spezies in der Gattung *Toxoplasma* ist, gibt es eine Vielzahl von Isolaten bzw. Stämmen, die sich unter anderem durch ihre unterschiedliche Virulenz auszeichnen. In Europa und Nordamerika dominieren hierbei im Wesentlichen drei klonale Linien von *T. gondii* (Typ I, II und III) (Howe und Sibley, 1995; Sibley und Boothroyd, 1992; Sibley und Howe, 1996). Am häufigsten wurden Isolate der Linie II im Zusammenhang mit Infektionen des

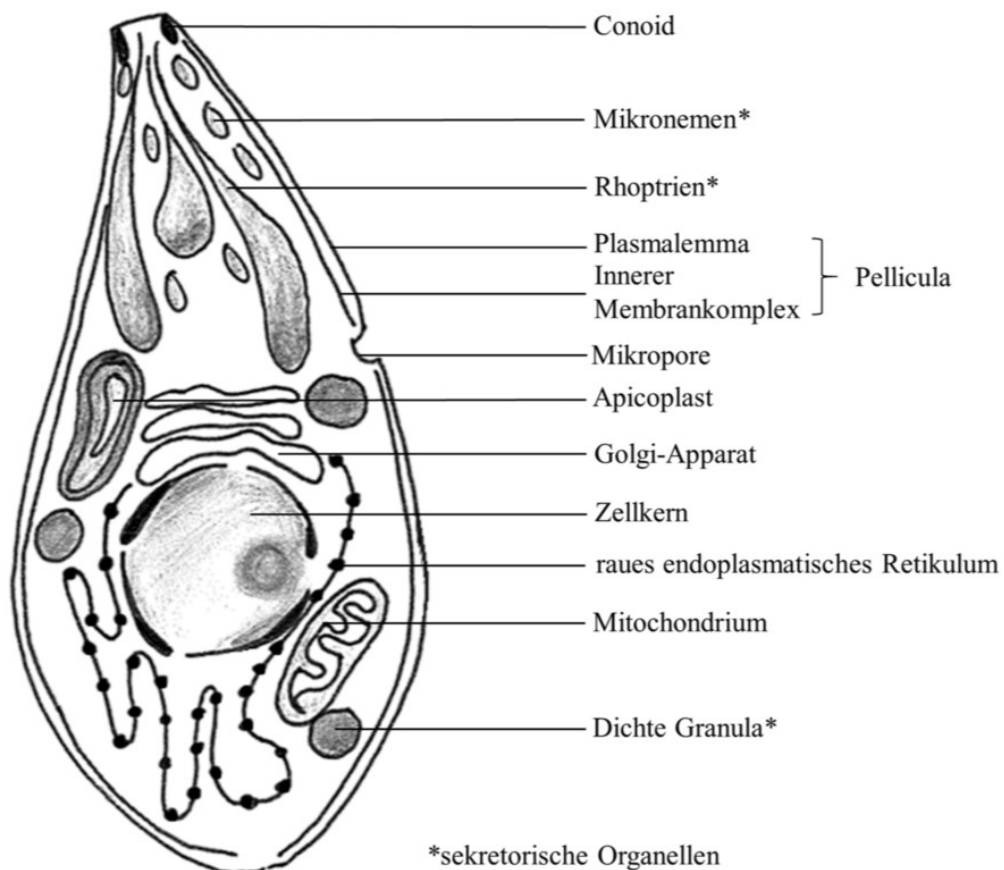


Menschen, aber auch bei *T. gondii*-assoziierten Abortgeschehen beim Schaf in Europa nachgewiesen (Ajzenberg et al., 2002; Chessa et al., 2014; Fernández-Escobar et al., 2020; Honoré et al., 2000; Owen und Trees, 1999).

## 1.2. Morphologie

In seinem Entwicklungszyklus tritt *T. gondii* in drei unterschiedlichen infektiösen Stadien auf (Dubey et al., 1998). **Tachyzoiten** (Frenkel, 1973) sind die sich rasch vermehrenden Entwicklungsstadien des Erregers; sie können in kernhaltige Zellen eines Wirts aktiv eindringen (Blader und Saeij, 2009; Dobrowolski und Sibley, 1996; Montoya und Liesenfeld, 2004). In der Wirtszelle vermehren sie sich asexuell durch Endodyogenie innerhalb einer parasitophoren Vakuole und liegen häufig in Gruppen aus mehreren Klonen, in sogenannten Gruppen (oder „Clustern“) vor (Blader und Saeij, 2009; Dubey et al., 1998; Sheffield und Melton, 1968). In histologischen Präparaten sind Tachyzoiten jedoch bei alleiniger Anwendung von Standardfärbungen häufig nicht vom umgebenden Gewebe zu unterscheiden und damit ohne die Anwendung spezifischer Nachweismethoden, wie der IHC, nicht erkennbar (Conley et al., 1981; Ugglä et al., 1987). **Bradyzoiten** (Frenkel, 1973) vermehren sich in gleicher Weise, jedoch deutlich langsamer, innerhalb einer intrazellulären Gewebezyste (Dubey et al., 1998; Ferguson und Hutchison, 1987a; Ferguson und Hutchison, 1987b). Die Gewebezysten, die anfänglich aus nur zwei Organismen bestehen und einen Durchmesser von 5 µm aufweisen, können im Laufe ihrer Entwicklung, abhängig vom Wirtsgewebe, auf eine Größe von durchschnittlich 50–70 µm, intramuskulär sogar auf bis zu 100 µm heranwachsen und mehrere hundert Organismen enthalten. Häufig persistieren diese Zysten lebenslang reaktionslos in den Organen des Wirtes, bevorzugt in Nerven- und Muskelgewebe (Dubey et al., 1998; Weiss und Kim, 2000). **Sporozoiten** entstehen im Rahmen der Sporulation und liegen jeweils zu viert in zwei Sporozysten gegen äußere Einflüsse geschützt im Inneren der Oozyste. Die rundlichen Oozysten, die über den Kot von Katzenartigen (Feliden) in die Umwelt ausgeschieden werden, besitzen einen Durchmesser von 10 (unsporuliert) bis 13 µm (sporuliert) (Dubey et al., 1998; Hill et al., 2005). Morphologisch unterscheiden sich die drei genannten Stadien nur geringfügig voneinander. Sie sind etwa 6 bis 8 µm lang, 1,5 bis 2 µm breit und leicht halbmondförmig gebogen, mit einem spitz zulaufenden vorderen und einem abgerundeten hinteren Ende (Dubey et al., 1998). Neben den für Eukaryonten charakteristischen Zellorganellen wie Zellkern,

Golgi-Apparat, Ribosomen und endoplasmatischem Retikulum, besitzt *T. gondii*, wie alle zu den Apicomplexa gehörenden Arten, an seinem vorderen (apikalen) Ende einen sogenannten Apikalkomplex. Dieser besteht aus spezifischen Organellen (u. a. dem Conoid, Rhoptrien und Mikronemen), die dem Parasiten beim Eindringen in die Wirtszelle dienen und für die intrazelluläre Bildung der parasitophoren Vakuole relevant sind (Deplazes et al., 2013; Dubey et al., 1998; Ferguson und Dubremetz, 2014; Levine, 1970). Neben seiner besonderen Zytoskelettstruktur und den charakteristischen sekretorischen Organellen besitzt der Einzeller ein spezielles Plastid, den sogenannten Apicoplasten. Umgeben wird der Parasit von einer komplexen Membranstruktur, der Pellicula (Dubey et al., 1998; Ferguson und Dubremetz, 2014) (Abbildung 2). Weitere Beschreibungen der Ultrastruktur und Möglichkeiten der Unterscheidung der Stadien auf ultrastruktureller Ebene finden sich bei Dubey et al. (1998) sowie Ferguson und Dubremetz (2014).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung eines *T. gondii* Tachyzoiten (modifiziert nach Dubey et al., 1998)

### 1.3. Entwicklungszyklus

Der Entwicklungszyklus von *T. gondii* ist fakultativ heteroxen, was bedeutet, dass der Einzeller verschiedene Wirtsspezies parasitieren kann (Deplazes et al. 2013). Die Besonderheit ist dabei, dass Toxoplasmen nicht nur zwischen End- und Zwischenwirten, sondern auch ausschließlich zwischen End- oder Zwischenwirten übertragen werden können (Robert-Gangneux und Dardé, 2012; Tenter et al., 2000) (Abbildung 3). Während vermutlich alle warmblütigen Tiere einschließlich des Menschen als Zwischenwirt für den Parasiten fungieren können, findet die sexuelle Vermehrung ausschließlich in Feliden als Endwirt statt (Dubey, 2010d; Miller et al., 1972; Tenter et al., 2000).

#### Entwicklung im Endwirt

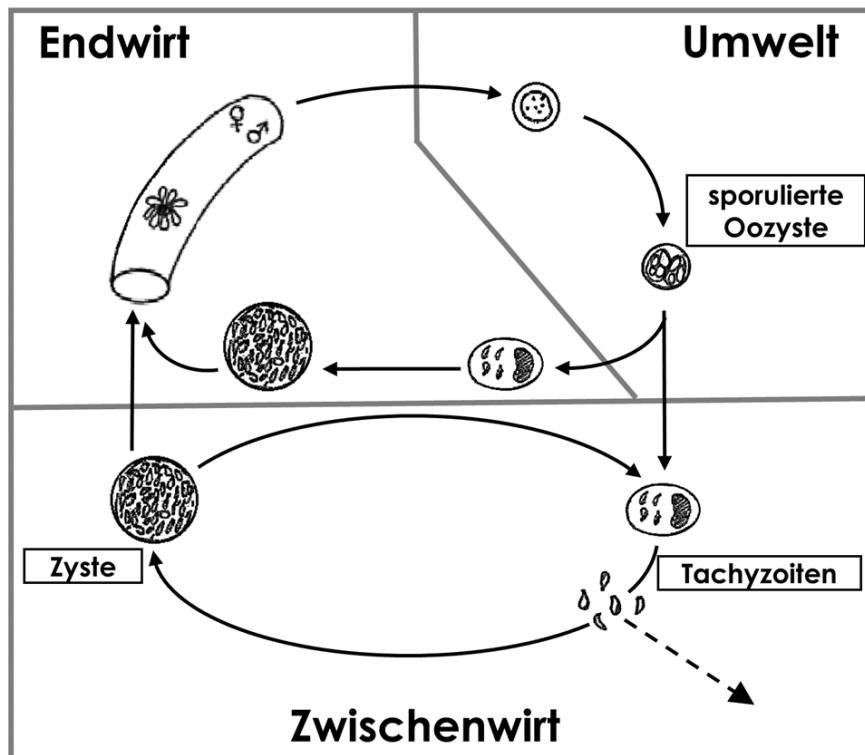
Nach der oralen Aufnahme von Gewebezysten durch einen Endwirt dringen die im Magen-Darm-Trakt durch proteolytische Enzyme freigesetzten Bradyzoiten in die Epithelzellen des Dünndarmes (Jejunum, Ileum) ein und vermehren sich dort zunächst asexuell in mehreren Generationen (Merogonie) (Deplazes et al., 2013; Dubey, 2010a; Dubey und Frenkel, 1972; Dubey et al., 1998). Mit der anschließenden Differenzierung zu geschlechtlichen Gametozyten (Gamonten) beginnt die sexuelle Phase der Entwicklung (Gamogonie), aus der nach der Befruchtung weiblicher (Makro-) Gameten durch männliche (Mikro-) Gameten die Oozysten hervorgehen. Diese werden nach einer Präpatenz von drei bis zehn Tagen durch die Ruptur infizierter Epithelzellen ins Darmlumen ausgeschieden und gelangen über den Kot in die Außenwelt (Dubey, 2001; Dubey, 2010a; Dubey und Frenkel, 1972; Dubey et al., 1998). Neben der Infektion mit Zysten (Bradyzoiten) können sich Katzen außerdem über die Aufnahme von Oozysten mit den darin enthaltenen Sporozoiten oder mit Tachyzoiten infizieren. Da hierbei zunächst eine extraintestinale Entwicklung (vgl. Entwicklung im Zwischenwirt) stattfindet, beträgt die Präpatenz mindestens 18 Tage (Dubey, 1996; Dubey, 2001; Dubey, 2002; Dubey, 2010a; Freyre et al., 1989). Die Ausscheidung von Oozysten ist abhängig vom immunologischen Status des Wirtes sowie dem aufgenommenen Erregerstadium. Bei Infektion einer naiven Katze kommt es nach der Aufnahme von Bradyzoiten fast immer zur Entstehung und Ausscheidung von Oozysten, wohingegen dies nach der Aufnahme von Oozysten oder Tachyzoiten

bei weniger als der Hälfte der Fall ist (Dubey, 1996; Dubey, 2001; Dubey, 2002; Dubey, 2005; Dubey, 2010a; Dubey und Frenkel, 1972; Dubey und Frenkel, 1976).

Bei günstigen Umweltbedingungen sporulieren die ausgeschiedenen Oozysten innerhalb von ein bis fünf Tagen und sind anschließend infektiös (Sporogonie) (Dubey, 2010a; Hill et al., 2005; Tenter et al., 2000).

### **Entwicklung im Zwischenwirt**

Im Zwischenwirt findet ausschließlich eine asexuelle Vermehrung durch Endodyogenie statt, die zweiphasig verläuft (Dubey, 2010a; Robert-Gangneux und Dardé, 2012; Tenter et al., 2000). Nach der oralen Aufnahme von sporulierten Oozysten dringen die freigewordenen Sporozoiten in die Wand des Dünndarmes ein und wandeln sich dort zu Tachyzoiten. Diese vermehren sich rasch intrazellulär und verbreiten sich lympho-hämatogen im gesamten Wirtsorganismus (akute Phase) (Dubey, 2010a; Dubey et al., 1997; Robert-Gangneux und Dardé, 2012; Speer und Dubey, 1998). In dieser Phase können die Tachyzoiten bei tragenden Tieren oder Schwangeren außerdem die Plazentaschranke überwinden, wodurch es zur vertikalen Übertragung des Erregers auf den Fetus kommt (Deplazes et al., 2013; Robert-Gangneux und Dardé, 2012; Tenter et al., 2000). Die zweite Entwicklungsphase beginnt mit dem Übergang der Tachyzoiten zu Bradyzoiten und wird durch die Immunantwort des Wirtes ausgelöst (Gross et al., 1996; Montoya und Liesenfeld, 2004). Erste Zysten bilden sich in den befallenen Organen bereits nach sechs Tagen p. i. aus (Dubey et al., 1997). Diese können ein Leben lang reaktionslos im Wirt persistieren und infektiös bleiben (Dubey et al., 1998; Weiss und Kim, 2000). Der Entwicklungszyklus schließt sich, wenn zystenhaltiges Gewebe (meist rohes oder unzureichend erhitztes Fleisch) durch einen Endwirt aufgenommen wird. Auch Zwischenwirte können sich über diesen Weg infizieren, in denen dann erneut ein asexueller Zyklus abläuft (Dubey, 2010a; Robert-Gangneux und Dardé, 2012; Tenter et al., 2000).



**Abbildung 3: Entwicklungszyklus von *T. gondii*.** Im Endwirt: asexuelle (Endodyogenie, Merogonie) und sexuelle Vermehrung (Gamogonie); in der Umwelt: Sporulation der Oozyste (Sporogonie); im Zwischenwirt: asexuelle Vermehrung (Endodyogenie); durchgezogene Pfeile: horizontale Übertragungswege; gestrichelter Pfeil: potentiell vertikaler Übertragungsweg (modifiziert nach Tenter und Fehllhaber, 2002).

#### 1.4. Zoonotisches Potential

Die Toxoplasmose ist eine weltweit häufig auftretende parasitäre Zoonose (Tenter et al., 2000). Ende der 1930er Jahre konnte Sabin (1939) erstmals nachweisen, dass *T. gondii*-Isolate von erkrankten Menschen und jene aus verschiedenen Tierarten gewonnenen Isolate derselben Art angehören. Heutzutage geht man davon aus, dass rund ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Erreger infiziert ist (Montoya und Liesenfeld, 2004). In einer ersten, im Jahr 2016 veröffentlichten, landesweiten repräsentativen Querschnittstudie, wurde für Deutschland eine Gesamtseroprävalenz von 55 % ermittelt, was vergleichsweise hoch ist. Die Prävalenz nimmt demnach mit steigendem Lebensalter durchschnittlich um ca. 1 % jährlich zu (20 % bei 18- bis 29-Jährigen bzw. 77 % bei 70- bis 79-Jährigen) (Wiling et al., 2016).

Menschen infizieren sich hauptsächlich über die orale Aufnahme von rohem oder unzureichend gegartem Fleisch, welches Gewebezysten enthält, oder über die Aufnahme von Oozysten aus der Umwelt, meist über kontaminiertes (Trink-)Wasser oder Nahrungsmittel (v. a. rohes Obst und Gemüse) (Dubey, 2004; Dubey, 2010b; Jones und Dubey, 2012; Montoya und Liesenfeld, 2004). In einer Studie von Cook et al. (2000) konnten zwischen 30 und 63 % der *T. gondii*-Infektionen schwangerer Frauen auf den Verzehr unzureichend gegarten Fleisches zurückgeführt werden. Unter anderem wurde der Verzehr von Schaf- bzw. Lammfleisch in nord- und mitteleuropäischen Ländern als Risikofaktor ermittelt (Baril et al., 1999; Cook et al., 2000; Kapperud et al., 1996). Schafe zählen neben Schweinen und Ziegen zu den Nutztieren, bei denen nach einer Infektion am häufigsten *T. gondii*-Zysten im Gewebe nachgewiesen werden können (Jones und Dubey, 2012; Tenter et al., 2000).

Während eine Infektion mit *T. gondii* bei gesunden, immunkompetenten Menschen meist asymptomatisch oder mit milden grippeähnlichen Symptomen verläuft, kann es bei bestimmten Risikogruppen wie immunsupprimierten Menschen oder Neugeborenen zu schweren Erkrankungen kommen (Dubey, 2004; Pleyer et al., 2019; Tenter et al., 2000).

Bei immunsupprimierten Menschen (z. B. Transplantations- oder AIDS-Patienten) kann sich die Toxoplasmose, meist durch Reaktivierung einer chronischen, latenten Infektion, zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung entwickeln (Liesenfeld et al., 1999; Montoya und Liesenfeld, 2004; Porter und Sande, 1992; RKI, 2020). Vor allem bei AIDS-Patienten kommt es am häufigsten zu einer durch Toxoplasmen bedingten Enzephalitis. Außerdem kann es zum Auftreten von Pneumonien, entzündlichen Augenveränderungen oder einer Generalisierung mit Multiorganbeteiligung kommen (Liesenfeld et al., 1999; Montoya und Liesenfeld, 2004; Pleyer et al., 2019; RKI, 2020).

Infiziert sich eine Frau erstmals während der Schwangerschaft mit *T. gondii*, kommt es in ca. 20 bis 50 % der Fälle zur transplazentalen (vertikalen) Übertragung des Erregers auf den Fetus; diese Form wird als kongenitale oder konnatale Toxoplasmose bezeichnet (Jones et al., 2001; Li et al., 2014). Je nach Zeitpunkt der Infektion kann es zu Aborten, milden bis schweren fetalen Schädigungen, vornehmlich mit Beteiligung des Zentralnervensystems, und daraus resultierenden Spätfolgen für das Kind kommen (McAuley, 2014; Remington et al., 2006; Tenter et al., 2000). Im

Jahr 2018 gingen 17 Meldungen von konnataler Toxoplasmose beim Robert-Koch-Institut (RKI) ein (RKI, 2019). Basierend auf den erhobenen Daten gehen Wilking et al. (2016) jedoch von einer hohen Dunkelziffer und real ca. 350 von Toxoplasmose betroffenen Neugeborene im Jahr aus.

Sowohl bei kongenital als auch postnatal erworbenen *T. gondii*-Infektionen kann es zur Erregerabsiedelung mit Ausbildung von entzündlichen Veränderungen im Auge (v. a. Retinochoroiditis bzw. Uveitis posterior; okuläre Toxoplasmose) kommen, die von visuellen Wahrnehmungsstörungen bis hin zu Sehverlust führen können (Maenz et al., 2014; Pleyer et al., 2019; Pleyer et al., 2007).

## **2. Ovine Toxoplasmose**

### **2.1. Epidemiologie**

Schafe sind häufig mit *T. gondii* infiziert. In einer Reihe von Studien aus den Jahren 1988 bis 2008 konnten spezifische Antikörper gegen *T. gondii* in Schafen weltweit nachgewiesen werden. Die Seroprävalenzen variierten dabei deutlich zwischen den untersuchten Regionen (3–96 %) (referiert in Dubey, 2009). Seineke (1996) ermittelte für Schafe in Niedersachsen eine Seroprävalenz von 33 %. Sting et al. (1997) wiesen spezifische Antikörper in 19 % der untersuchten Schafe aus Baden-Württemberg nach.

Verschiedene Studien zeigen, dass die Seroprävalenz mit steigendem Alter der Tiere zunimmt (Dubey und Kirkbride, 1989; Hutchinson et al., 2011; Katzer et al., 2011). Es wird daher angenommen, dass sich die meisten Schafe erst postnatal über die Aufnahme von sporulierten Oozysten aus der Umwelt (bspw. über kontaminiertes Futter, Weiden oder Wasser) mit *T. gondii* infizieren (Buxton et al., 2007; Buxton und Rodger, 2007; Dubey, 2009; Faull et al., 1986; Innes et al., 2009; Plant et al., 1974). Der Hauskatze als einzigem domestizierten Endwirt kommt dabei eine wichtige epidemiologische Rolle zu (Tenter et al., 2000). Nach erstmaliger Infektion können juvenile Katzen über eine Million Oozysten pro Gramm Kot ausscheiden und somit die Umwelt während der bis zu drei Wochen andauernden Patenz mit mehreren 100 Millionen Oozysten kontaminieren (Deplazes et al., 2013; Dubey, 2001; Dubey und Frenkel, 1972). Entsprechend fanden einige Studien eine positive Korrelation

zwischen der Anwesenheit von Katzen, vor allem junger Tiere, auf den Höfen bzw. in den Stallungen und dem Nachweis von *T. gondii*-Antikörpern in der Schafherde (Skjerve et al., 1998; Vesco et al., 2007); oder, wenn Katzen Zugang zu Tränkwasser hatten (Cenci-Goga et al., 2013). Ausgeschiedene Oozysten sporulieren in Abhängigkeit von Belüftung und Temperatur innerhalb von ein bis fünf Tagen und sind anschließend infektiös (Hill et al., 2005). Die Oozysten sind dann äußerst widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse und können in feuchter Umgebung über ein Jahr infektiös bleiben (Dubey, 2010a; Robert-Gangneux und Dardé, 2012; Tenter et al., 2000). Diesbezüglich beschreiben einige Autoren den Einfluss geographischer und klimatischer Faktoren auf die Infektionsrate in Schafherden (Jokelainen et al., 2010; Klun et al., 2006; Skjerve et al., 1998). Darüber hinaus sind sporulierte Oozysten äußerst resistent gegenüber etlichen Desinfektionsmitteln (Dubey, 2010a; Dubey et al., 1970a; Ito et al., 1975; Kuticic und Wikerhauser, 1996); Hitze von 55 bis 60 °C kann diese jedoch innerhalb von ein bis zwei Minuten abtöten (Dubey, 1998).

Im Zusammenhang mit Aborten beim Schaf wurde *T. gondii* erstmals in den 1950er Jahren beschrieben (Hartley et al., 1954; Hartley und Marshall, 1957). Mittlerweile wird *T. gondii* in Ländern wie Neuseeland, Australien, dem Vereinigten Königreich, Norwegen und den USA als einer der häufigsten Aborterreger beim Schaf angesehen (Dubey, 2009; Dubey, 2010c). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht europäischer Studien, die (unter anderem) das Vorkommen des Erregers im Zusammenhang mit natürlich aufgetretenen Schafaborten untersucht haben.

Experimentelle Studien zeigen, dass bereits 100 bis 200 Oozysten ausreichen können, um einen Abort nach Erstinfektion eines Muttertieres auszulösen (Kirkbride et al., 1992; McColgan et al., 1988). Der Erreger wird dabei transplazental (vertikal) von der Mutter auf den Fetus übertragen (Buxton und Rodger, 2007; Innes et al., 2009; Moeller, 2012). Die Übertragung des Erregers von persistent infizierten Mutterschafen auf den Fetus scheint bei der ovinen Toxoplasmose eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (Buxton et al., 2007; Buxton et al., 2006; Dubey, 2010c).



Tabelle 1: Übersicht von Studien zum Vorkommen von *T. gondii* bei Schafaborten

Land	Anzahl der Proben (Untersuchungsmaterial)	Material	Methode	Ergebnisse		Quellenangabe
				positiv getestete Proben/Gesamt	positiver Anteil	
<b>Deutschland</b>	47 (Schafaborte)	Eihaut, fetale Organe	PCR: B1-Gen	5/47	11 %	(Steuber et al., 1995)
<b>Irland</b>	489 (Gewebeproben von Schafaborten)	Gehirn	real-time PCR: 529-bp RE	15/91		
		Eihaut	real-time PCR: 529-bp RE	9/46	10–20 %	(Gutierrez et al., 2012)
		alle Proben	real-time PCR: 529-bp RE	51/489		
<b>Italien</b>	715 (582 Schaffeten, 133 Eihäute)	Gehirn	nested-PCR: ITS1	63/499	13–32 %	(Masala et al., 2003)
		Eihaut	nested-PCR: ITS1	42/133		
	368 (292 Schaffeten, 76 Eihäute)	Fetus	nested-PCR: ITS1	53/292	13–18 %	(Masala et al., 2007)
		Eihaut	nested-PCR: ITS1	10/76		
	161 (Gewebeproben von Schafaborten)	Eihaut	nested-PCR: ITS1	5/142		
		Gehirn	nested-PCR: ITS1	14/16	4–87 %	(Chessa et al., 2014)
<b>Schweiz</b>	86 (Schafaborte)	nicht angegeben (vermutlich Eihaut)	IHC, pAk	16/86	19 %	(Chanton- Greutmann et al., 2002)
	41 (Schafaborte)	Gehirn, Eihaut	real-time PCR: B1-Gen	3/17	18 %	(Schnydrig et al., 2017)

53 (Schafaborte und Totgeburten)	Gehirn	Histologie	5/53	
	fetale Flüssigkeiten	IFAT	12/43	9–28 % (Hurtado et al., 2001)
	Gehirn, Milz	nested-PCR: ITS1	10/53	
	Eihaut	nested-PCR: ITS1	3/11	
173 (Schafaborte)	Gehirn, Herz, Leber, Kotyledonen	Histologie	15/173	
	Serum, Thoraxflüssigkeit	IFAT/ELISA	30/106	7–28 % (Pereira-Bueno et al., 2004)
	Gehirn	nested-PCR: B1-Gen	12/173	
	Feten	Gesamtprävalenz *	40/173	
	Gehirn	Histologie	8/74	5–11 % (Moreno et al., 2012)
	Gehirn	nested-PCR: ITS1	4/74	
59 (Schaffeten mit Eihaut)	Kotyledonen	IHC, pAk	5/59	8 % (Szeredi und Bacsadi, 2002)
	Eihaut	IHC, pAk	2/246	1 % (Szeredi et al., 2006)

\* Anzahl der Schafaborte, die mit mindestens einer der durchgeführten Diagnostikmethoden (Histologie, IFAT/ELISA, PCR) positiv getestet wurden

## 2.2. Pathogenese, Klinik und Pathologie

Zu einer klinisch manifesten ovinen Toxoplasmose kann es kommen, wenn sich ein naives Mutterschaf erstmals während der Trächtigkeit mit *T. gondii* infiziert (Buxton et al., 2007; McColgan et al., 1988). Nach der oralen Aufnahme sporulierter Oozysten dringen die exzystierten Sporozoiten in die Wand des Dünndarmes ein und vermehren sich zunächst in der intestinalen Submukosa sowie den assoziierten mesenterialen Lymphknoten, bevor sich die Tachyzoiten lympho-hämatogen im gesamten Organismus des Muttertieres ausbreitet (Buxton und Rodger, 2007; Dubey, 2010c). Das Mutterschaf zeigt in dieser Zeit (bis ca. zwei Wochen p. i.) in der Regel keine Symptome. Milde gastrointestinale bzw. respiratorische Symptome oder Fieber können begleitend auftreten (Buxton et al., 2007; Dubey, 2010c; Moeller, 2012). Die Infektion des Fetus erfolgt am Ende der parasitärischen Phase ca. 14 Tage p. i. (Dubey, 2010c). Die Tachyzoiten besiedeln den graviden Uterus und vermehren sich in den Plazentomen, zunächst im maternalen Teil (Karunkeln) und anschließend im fetalen Teil (Kotyledonen). Von dort aus breiten sie sich im gesamten Fetus aus (Buxton und Finlayson, 1986; Buxton und Rodger, 2007).

Das klinische Erscheinungsbild ist abhängig vom Zeitpunkt der Trächtigkeit, an dem sich das Muttertier infiziert. In der frühen Trächtigkeit kommt es meist zum embryonalen bzw. fetalen Tod und Resorption des Embryos/Fetus. Abortgeschehen sind am häufigsten bei einer Infektion des Muttertieres zwischen dem 60. und 90. Trächtigkeitstag beschrieben, wobei zwischen der Infektion des Mutterschafs und dem Auftreten des Abortes üblicherweise weitere vier Wochen vergehen. Neben Totgeburten mit oder ohne Mumifikation kann es auch zur Geburt lebensschwacher Lämmer kommen. Bei Infektionen im letzten Trächtigkeitsmonat können auch klinisch unauffällige oder nur geringgradig erkrankte Lämmer geboren werden, die jedoch persistent infiziert und immun sind (Buxton et al., 2007; Buxton und Rodger, 2007; Dubey, 2010c; Moeller, 2012).

**Makroskopisch** finden sich im Fetus keine pathognomonischen Veränderungen (Dubey, 2010c; Moeller, 2012). Selten finden sich kleine verkalkte Knötchen im Leber- oder Gehirngewebe. Ansonsten weisen Feten meist unspezifische Veränderungen auf, die generell bei Aborten zu beobachten sind wie Unterhautödeme, Ergüsse in den Körperhöhlen oder unterschiedliche Grade der Autolyse oder Mumifikation (Buxton, 1998; Hartley und Kater, 1963). Als charakteristisch

gelten hingegen multifokale weiße, zum Teil verkalkte bis zu 2 mm große Entzündungs- bzw. Nekroseherde in den Kotyledonen der Plazenta. Zwischen den Kotyledonen sind in der Regel bis auf geringgradige Ödeme keine Veränderungen festzustellen (Beverley et al., 1971; Buxton, 1998; Dubey, 2010c; Hartley und Kater, 1963).

Die **histopathologischen** Veränderungen in den fetalen Organen und der Eihaut sind grundsätzlich dieselben und bestehen, ungeachtet des Infektionszeitpunktes, aus Nekrosen, zusammen mit einer mehr oder minder stark ausgeprägten vornehmlich nichteitrigen Entzündung. Hierbei bestimmt der Zeitpunkt der Infektion den Schweregrad der Läsionen sowie die Zeitspanne p. i., wann diese auftreten. In der frühen Trächtigkeit bestehen Läsionen hauptsächlich aus nekrotischen Veränderungen ohne nennenswerte Beteiligung von Entzündungszellen. Mit der Reifung des fetalen Immunsystems ab Mitte der Trächtigkeit nehmen die Entzündungszell-Infiltrate in den Läsionen zu (Benavides et al., 2017; Buxton und Finlayson, 1986).

Das Gehirn ist das fetale Organ, in dem am häufigsten Veränderungen zu beobachten sind. Charakteristische Läsionen bestehen aus multifokalen Nekroseherden sowie Gliazellknötchen mit und ohne zentrale Nekrose, die verkalken können. Des Weiteren können nichteitrige, perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate oder eine nichteitrige Meningoenzephalitis auftreten (Benavides et al., 2017; Buxton et al., 1982; Dubey, 2010c; Hartley und Kater, 1963; Moeller, 2012). Auch in anderen fetalen Organen wie Skelettmuskulatur, Herz, Lunge und Leber können Veränderungen, meist in Form geringgradiger mononukleärer Entzündungszellinfiltrate vorkommen (Benavides et al., 2017; Hartley und Kater, 1963; Moeller, 2012).

In der Plazenta bestehen die histologischen Veränderungen in erster Linie aus multifokalen Koagulationsnekrosen, die im Verlauf der Infektion und mit zunehmender Trächtigkeitsdauer an Anzahl und Ausdehnung zunehmen und konfluieren können. Neben mononukleären Entzündungszellinfiltraten können auch neutrophile Granulozyten auftreten. Ältere Nekroseherde sind häufig weitgehend verkalkt (Buxton und Finlayson, 1986; Dubey, 2010c; Hartley und Kater, 1963).

Die genauen Mechanismen, die der Pathogenese der Toxoplasmose zugrunde liegen, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Man geht jedoch davon aus, dass neben der

Vermehrung und Schädigung durch den Parasiten selbst, insbesondere die Veränderungen in der fetalen und der maternalen Immunantwort die klinische Ausprägung der Erkrankung entscheidend beeinflussen (Benavides et al., 2017). Darüber hinaus könnten weitere Faktoren wie die Schafrasse, unterschiedlich virulente *T. gondii*-Stämme oder die Infektionsdosis bzw. Anzahl der Organismen eine Rolle spielen (Benavides et al., 2017; Dubey, 2010c).

### **2.3. Bekämpfung und Prophylaxe**

Aufgrund der weiten Verbreitung von *Toxoplasma*-Oozysten in der Umwelt kommt dem Aufbau einer schützenden Immunität vor der ersten Paarung die größte Bedeutung zu (Dabritz et al., 2007; Innes et al., 2009). Neben der Vakzination spielen auch eine gute Futter- und Tränkehygiene mit dem Ziel, eine Kontamination mit Oozysten zu vermeiden, eine wichtige Rolle (Innes et al., 2009). Eine attenuierte Lebendvakzine (Toxovax®) ist in einigen Ländern wie dem Vereinigten Königreich, Irland, Neuseeland und Frankreich kommerziell verfügbar (Innes et al., 2019). Es wird empfohlen, Mutterschafe mindestens drei Wochen vor der Paarung zu behandeln. Die vakzinierten Schafe entwickeln dadurch eine schützende Immunität, die mindestens 18 Monate vorhalten soll (Buxton und Innes, 1995; Buxton und Rodger, 2007; Dubey, 2009).

## **3. Diagnostik der Toxoplasmose**

### **3.1. Direkte Nachweismethoden**

#### **3.1.1. Erregerisolierung**

Grundsätzlich gilt die Isolation von *T. gondii* durch einen Bioassay in Labortieren als Goldstandard zum Nachweis des Erregers (Liu et al., 2015). Für die Isolierung des Erregers aus Schafaborten sind Gehirn und Plazenta am besten für eine Beimpfung von Mäusen geeignet (Dubey, 2010c). Neben Labortieren, kann *T. gondii* außerdem in Hühnerembryonen oder Zellkulturen angezüchtet werden (Dubey, 2010a). Da eine Diagnosestellung mit diesen beiden Methoden jedoch langwierig (beim Nachweis im Labortier ca. sechs bis acht Wochen) und teuer ist und die Proben häufig stark kontaminiert sind, werden sie von den meisten Diagnostiklaboren nicht praktiziert (Buxton, 1998; Dubey, 2010c).

### 3.1.2. Mikroskopischer Erregernachweis und histologische Untersuchung

Ursprünglich basierte der Nachweis von *T. gondii*-Stadien in Kot-, Wasser- und Umweltproben (Oozyten) sowie im Gewebe (Tachyzoiten und Gewebezysten) auf mikroskopischen Untersuchungsmethoden. Ein alleiniger mikroskopischer Nachweis ist jedoch wenig sensitiv und daher unzuverlässig (Liu et al., 2015). An Giemsa gefärbten Abklatschpräparaten veränderter, im Rahmen von Sektionen entnommener Organe (bei Schafaborten vor allem Plazenta, Lunge oder Gehirn) kann eine schnelle Diagnose gestellt werden, sofern intakte, halbmondförmige *T. gondii*-Stadien zu erkennen sind (Dubey, 2010a; Dubey, 2010c; Hill und Dubey, 2002).

Bei der histologischen Untersuchung auf ovine Toxoplasmose steht jedoch besonders die Identifizierung charakteristischer mikroskopischer Gewebeveränderungen in abortierten Feten und Eihäuten (vgl. Abschnitt II. 2.2) anstelle des Parasiten selbst im Vordergrund. Dies hat denn Grund, dass *T. gondii* Organismen nur selten in H&E-Schnitten fetaler Organe zu erkennen sind (Dubey, 2010c; Hartley und Kater, 1963; Uggla et al., 1987). Tachyzoiten stellen sich meist oval bis rund dar (Dubey, 2010a; Hill und Dubey, 2002), können aber vor allem in der Plazenta oft kaum von Zell- bzw. Kerntrümmern unterschieden werden (Dubey, 2010c). Gelegentlich können Gewebezysten in histologischen Schnitten beobachtet werden (Dubey, 2010c), insbesondere bei Anwendung geeigneter Spezialfärbungen wie der Giemsa- oder PAS-Färbung (Conley und Jenkins, 1981; Da Silva et al., 2010; Hill und Dubey, 2002; Liu et al., 2015). Diese stellen sich kugelig (im Gehirn) bis länglich (in der Muskulatur) dar und erreichen einen Durchmesser von durchschnittlich 50–70 µm (Dubey et al., 1998; Weiss und Kim, 2000). Sie sind nicht gekammert und besitzen eine dünne Zystenwand (< 0,5 µm), anhand derer man sie lichtmikroskopisch von *N. caninum*-Zysten unterscheiden kann (Deplazes et al., 2013; Dubey et al., 2002; Dubey et al., 1998).

### 3.1.3. Immunhistochemie

Seit ihrer ersten Beschreibung im Jahr 1941 (Coons et al., 1941), hat sich die Immunhistochemie (IHC; auch Immunhistologie) zu einem wertvollen Instrument in der Diagnostik und in der Erforschung infektiöser sowie neoplastischer Krankheiten in einer Vielzahl von Tierarten entwickelt. Das Grundprinzip der IHC basiert dabei auf der Darstellung bestimmter Antigene in Gewebeschnitten unter Zuhilfenahme

spezifischer Antikörper. Die Antigen-Antikörper-Bindung wird anschließend durch eine histochemische Farbreaktion für die Betrachtung unter dem Licht- oder Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Hierfür werden primäre, sekundäre oder tertiäre Antikörper meist mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen markiert. Am häufigsten kommen als Enzyme die Meerrettich-Peroxidase oder die alkalische Phosphatase zum Einsatz, die in Anwesenheit eines spezifischen Substrates und Chromogens gefärbte Präzipitate an der Bindungsstelle bilden (Ramos-Vara, 2005). Neben den vor allem früher häufig verwendeten Mehrschritt-Detektionssystemen, wie der Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode (PAP), der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP) oder dem Biotin-(Strept-) Avidin-Verfahren, bei denen die hohe Bindungsaffinität zwischen Avidin bzw. Streptavidin und Biotin ausgenutzt wird, wurden in den letzten Jahrzehnten vermehrt auch polymerbasierte Methoden entwickelt (Cartun et al., 2018). Bei der Zwei-Schritt-Polymer-Methode ist der Sekundärantikörper mit einem Polymergerüst konjugiert, an welches eine Vielzahl von Enzymmolekülen gebunden sind. Vorteile dieser Methode sind die einfachere Handhabung, verglichen mit Drei-Schritt-Methoden, die höhere Sensitivität sowie eine verringerte, durch endogenes Biotin oder Avidin bedingte Hintergrundfärbung. Polymer-Detektionssysteme sind heutzutage von vielen kommerziellen Anbietern erhältlich (Cartun et al., 2018; Ramos-Vara, 2005).

Durch immunhistochemische Anfärbung können Entwicklungsstadien von *T. gondii* im Rahmen der Diagnostik von Schafaborten direkt in Paraffinschnitten dargestellt werden (Borel et al., 2014; Moeller, 2012; Ugglä et al., 1987). Neben der Detektion intakter *T. gondii*-Stadien ermöglicht die Methode außerdem den Nachweis antigener Überreste des Erregers in Gewebeschnitten, was besonders für den Nachweis in schlecht erhaltenem (autolytischem) Gewebe von Vorteil ist (Buxton, 1998; Ugglä et al., 1987). Laut Dubey (2010a) sind für den immunhistochemischen Nachweis von Toxoplasmen polyklonale Antikörper in der Regel besser geeignet als monoklonale, wobei die Spezifität von der Qualität des Antikörpers abhängig ist. Gelegentlich wurden in der Literatur Kreuzreaktionen vor allem polyklonaler, aber auch einzelner monoklonaler *T. gondii*-Antikörper mit dem antigenetisch nahe verwandten Erreger *N. caninum* beschrieben (McAllister et al., 1996b; Sundermann et al., 1997). Für den immunhistochemischen Nachweis von *T. gondii* in Abortmaterial von Schafen wird meist Eihaut als Untersuchungsmaterial verwendet (Hazlett et al., 2013; Szeredi und

Bacsadi, 2002; Szeredi et al., 2006). Die Beobachtungen verschiedener Autoren zeigen, dass *T. gondii*-Antigen, das sich meist als diffuse Anfärbung oder als kleine, von zugrunde gegangenen Organismen stammende Ansammlungen darstellt, gewöhnlich in großen Mengen in und um die nekrotischen Herden der Kotyledonen zu finden ist. Gelegentlich sind auch einzelne intakte Tachyzoiten oder Tachyzoiten-Cluster, u. a. in Trophoblastzellen, zu erkennen (Szeredi und Bacsadi, 2002; Szeredi et al., 2006; Uggla et al., 1987). In den fetalen Organen können Zysten oder Tachyzoiten, die intrazellulär, einzeln oder in Gruppen von bis zu zehn Erregern vorliegen, beobachtet werden (Uggla et al., 1987).

### **3.1.4. In-situ-Hybridisierung**

Die In-situ-Hybridisierung (ISH) ist eine Methode, mit der spezifische DNA- und RNA-Sequenzen direkt im biologischen Präparat (*in situ*), beispielsweise in Zellen oder Gewebeschnitten, durch die Hybridisierung mit einer komplementären Nucleotid-Sonde detektiert und lokalisiert werden können (Jensen, 2014; Leitch et al., 1994). Zur Visualisierung der gebundenen Sonde ist diese entweder mit radioaktiven Isotopen (radioaktive Markierung), mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder mit einem immunogenen Markermolekül wie beispielsweise Digoxigenin oder Biotin (nichtradioaktive Markierung) markiert. Bei letzterem erfolgt die endgültige Sichtbarmachung erst durch ein nachgeschaltetes, histochemisches bzw. immunhistochemisches Detektionssystem (indirekte Markierung) (Jin und Lloyd, 1997; Leitch et al., 1994). Durch die Verwendung enzymmarkierter Antikörper, kann die hybridisierte Sonde durch ein Chromogen für die lichtmikroskopische Untersuchung sichtbar gemacht werden (chromogene ISH) (Jensen, 2014; Tanner et al., 2000). In Folgendem wird der Begriff „ISH“ für die chromogene In-situ-Hybridisierung verwendet.

Die ISH hat sich in den letzten Jahren, auch in der Tiermedizin, zu einer üblichen Technik in der pathologischen Diagnostik zum Nachweis verschiedener Pathogene, wie Viren, Bakterien, Pilzen sowie Protozoen in Gewebeschnitten, entwickelt (Mostegl et al., 2011). Hierbei werden in der Regel Digoxigenin-markierte Oligonucleotid-Sonden verwendet, die – mit Ausnahme von Viren – an spezifische Abschnitte der rRNA binden (Chvala et al., 2006; Dinhopf et al., 2011a; Hayden et al., 2001; Hayden et al., 2003; Menezes et al., 2013; Mostegl et al., 2011; Susta et al., 2009; Weissenböck et al., 2007). Ähnlich der IHC erlaubt die ISH den Nachweis eines



Erregers direkt in Beziehung zur Gewebemorphologie sowie zu mikroskopischen Veränderungen. Die Methode wird in erster Linie an Schnitten formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebes durchgeführt (Mostegl et al., 2011).

Ein ISH-Nachweis von *T. gondii*-Stadien in humanem sowie in murinem Gewebe wurde bereits von einigen Autoren beschrieben (Liu et al., 1998; Ma et al., 2008; Montone, 1994; Schoondermark-Van De Ven et al., 1993). Nach unserem Kenntnisstand findet die Methode jedoch bisher keine Anwendung in der Routinediagnostik.

### 3.1.5. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur in-vitro Amplifizierung eines spezifischen DNA-Fragmentes durch das Enzym Polymerase (v. a. thermostabile Taq-Polymerase) (Liu et al., 2015; Saiki et al., 1988). Sie ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung selbst kleinster DNA-Mengen in ca. 30 bis 40 aufeinanderfolgenden Zyklen. Ein Zyklus besteht dabei aus der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs (bei 94–95 °C), der Anlagerung spezifischer Oligonucleotid-Primer an jeweils einen der DNA-Stränge (Annealing; 55–65 °C) und der Synthese eines neuen komplementären DNA-Stranges durch Verlängerung (Elongation bzw. Extention; ca. 72 °C) der Primer durch den Einbau von Nukleinsäurebausteinen (Desoxyribonukleosidtriphosphate, dNTPs) (Overbergh et al., 2017). Bei der konventionellen PCR findet der Nachweis des gesuchten Genabschnittes dabei erst nach der Amplifikation, durch die Auftrennung der DNA-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese, statt. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der real-time PCR die Detektion des Amplikons bereits während des PCR Laufes anhand eines Fluoreszenzsignales (Overbergh et al., 2017).

Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, werden für den Nachweis von *T. gondii* meist Genabschnitte verwendet, die in vielfachen Kopien im Genom des Erregers vorhanden sind. Hierzu gehören unter anderem das B1-Gen (Burg et al., 1989), das 529-bp-Fragment (Homan et al., 2000), die ITS1 (internal transcribed spacer) Region oder das 18S-rRNA-Gen (Liu et al., 2015).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich für den Nachweis des Parasiten in abortierten Schaffeten sowohl das B1-Gen als auch die ITS1-Region als Zielsequenz eignen (Hurtado et al., 2001; Owen et al., 1998; Steuber et al., 1995). Um eine höhere

Sensitivität zu erzielen, wird häufig eine nested-PCR durchgeführt (Hurtado et al., 2001; Liu et al., 2015). Bei dieser Form der PCR dient das Produkt einer ersten PCR-Reaktion als Matrize für einen zweiten PCR-Lauf, bei dem die Primersequenzen innerhalb des ersten Amplifikationsproduktes liegen (Arnemann, 2019). In den letzten Jahren findet außerdem die real-time PCR zum Nachweis des B1-Gens oder des 529-bp-Fragmentes Anwendung in der Diagnostik bei Schafaborten (Gutierrez et al., 2012; Gutierrez et al., 2010; Schnydrig et al., 2017). Seit 2019 steht in Deutschland ein vom Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) zugelassenes real-time PCR-Kit zum Nachweis von *T. gondii*-DNA im Gewebe von Wiederkäuern zur Verfügung (FLI, 2020).

Vor allem Plazenta mit Kotyledonen, aber auch fetales Gehirn, gelten als Gewebe der Wahl für den Nachweis von *T. gondii*-DNA in ovinem Abortmaterial (Gutierrez et al., 2010; Hurtado et al., 2001; Masala et al., 2003; Owen et al., 1998).

### **3.2. Indirekte Nachweismethoden**

#### **Serologische Untersuchungsmethoden**

Eine Vielzahl serologischer Testmethoden wurden für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen *T. gondii* entwickelt (Hill und Dubey, 2002; Liu et al., 2015; Montoya, 2002). Das FLI hat in den letzten Jahren mehrere kommerzielle serologische Testsysteme (indirekte Immunfluoreszenztests sowie ELISA) für den Nachweis von *T. gondii*-Antikörpern in verschiedenen Tierarten zugelassen (FLI, 2020).

Auch in der Diagnostik *T. gondii*-induzierter Schafaborte spielt der serologische Nachweis eine wichtige Rolle (Buxton, 1998). Da maternale Antikörper beim Wiederkäuer nicht diaplazentar übertragen werden, gilt der Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *T. gondii* im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten abortierter Schaffeten und neugeborenen Lämmern vor der ersten Kolostrumaufnahme als Beleg für eine intrauterine Infektion (Buxton, 1998; Buxton und Rodger, 2007; Deplazes et al., 2013; Dubey, 2010c). Fehlende Antikörper schließen eine mögliche Infektion jedoch nicht aus, da die fetale Immunantwort und die damit einhergehende Produktion von Antikörpern sowohl vom Alter des Fetus (ca. ab dem 70. Tag der Trächtigkeit), als auch von der Dauer zwischen dem Zeitpunkt der

Infektion und der Untersuchung abhängig ist (Buxton und Finlayson, 1986; Dubey, 2010c). Üblicherweise werden ein modifizierter Agglutinationstest (MAT), ein indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-test (IFAT) oder ein Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) für den Nachweis spezifischer *T. gondii*-Antikörper in Schaffeten verwendet (Dubey und Kirkbride, 1990; Dubey et al., 1990; Hurtado et al., 2001; Kirkbride, 1993; Pereira-Bueno et al., 2004; Seefeldt et al., 1989). Indirekte Hämagglutinations-Tests (IHT) und Latex-Agglutinationstests (LAT) gelten als weniger sensitiv bei der Detektion von Antikörpern in ovinen Feten (Dubey et al., 1987). Eine serologische Untersuchung des abortierenden Mutterschafes ist, aufgrund der hohen (Sero-) Prävalenz in Schafen (vgl. Abschnitt II. 2.1) und der Bildung hoher, über lange Zeit persistierender Titer, nicht diagnostisch verwertbar (Dubey, 2010c).

#### **4. *Neospora caninum* als differentialdiagnostischer Aborterreger beim Schaf**

Als Differentialdiagnose zur ovinen Toxoplasmose kommen bei Aborten kleiner Wiederkäuer insbesondere Infektionen mit anderen Aborterregern, hierzulande vor allem Chlamydien, Coxiellen, *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* und *Campylobacter jejuni*, Salmonellen, Pestiviren sowie *N. caninum* in Betracht (FLI, 2019).

Besonders für *N. caninum*, ein Erreger, der phylogenetisch nahe mit *T. gondii* verwandt ist (Ellis et al., 1994; Holmdahl et al., 1994), konnte in experimentellen Infektionsversuchen eine hohe Ähnlichkeit zum klinischen Erscheinungsbild und den pathologischen Veränderungen der ovinen Toxoplasmose festgestellt werden. Makroskopisch konnten auch hier in den Kotyledonen der Plazenta multifokale, weißliche Nekroseherde beobachtet werden. Histopathologische Veränderungen fand man am häufigsten im fetalen zentralen Nervensystem und in der Plazenta, seltener in Leber, Herz, Lunge und Muskulatur der Feten (Buxton et al., 1997; Buxton et al., 1998; Dubey und Lindsay, 1990; McAllister et al., 1996a).

Obwohl der Erreger, im Gegensatz zu *T. gondii*, in der Regel nur sporadisch mit natürlich auftretenden Abortgeschehen bei kleinen Wiederkäuern in Verbindung gebracht wird, konnten beispielsweise Moreno et al. (2012) *N. caninum* (5/74) in Spanien ebenso häufig nachweisen wie *T. gondii* (4/74).

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht von Studien zum Vorkommen von *N. caninum* im Zusammenhang mit Schafaborten.

Aufgrund der gleichartigen morphologischen Veränderungen benötigt man zur Unterscheidung beider Erreger spezifische Nachweisverfahren wie beispielsweise die PCR (Moreno et al., 2012) oder die IHC (Dubey und Lindsay, 1990; McAllister et al., 1996a). Dabei sollte bei der Auswahl des Primärantikörpers für die IHC insbesondere auf die Spezifität geachtet werden, da es aufgrund gemeinsamer antigener Determinanten der beiden Einzeller zu Kreuzreaktionen kommen kann (Dubey und Lindsay, 1990; McAllister et al., 1996a; McAllister et al., 1996b; Sundermann et al., 1997). In Gewebeschnitten weisen Gewebezysten von *N. caninum*, die fast ausschließlich im Nervengewebe zu finden sind, eine bis zu 4 µm dicke Wand auf, wohingegen jene von *T. gondii* eine dünnere (< 0,5 µm) Wand besitzen und auch in extraneuralem Gewebe vorkommen können (Dubey et al., 2002; Dubey und Lindsay, 1990; McAllister et al., 1996a). In vielen Fällen klinischer Neosporose und Toxoplasmose können jedoch häufig keine Gewebezysten beobachtet werden (Dubey und Lindsay, 1990; McAllister et al., 1996a).

Tabelle 2: Übersicht von Studien zum Vorkommen von *N. caninum* bei natürlich aufgetretenen Schafaborten

Land	Anzahl untersuchter Herden	Anzahl der Proben (Untersuchungsmaterial)	Material	Methode	Ergebnisse		Quellenangabe
					positiv getestete Proben/Gesamt	positiver Anteil	
<b>Iran</b>	keine Angabe	71 (Schaffeten)	Gehirn	PCR: Nc5-Region	7/71	10 %	(Razmi und Naseri, 2017)
	15	70 (Schafaborte)	Fetus (inkl. Eihaut)	PCR: Nc5-Region	6/70	9 %	(Asadpour et al., 2013)
<b>Italien</b>	98	368 (292 Schaffeten, 76 Eihäute)	Fetus Eihaut	nested-PCR: ITS1 nested-PCR: ITS1	6/292 0/76	0–2 %	(Masala et al., 2007)
	2	5 (Schafaborte)	fetale Flüssigkeiten	IFAT	4/5	80 %	(West et al., 2006)
<b>Neuseeland</b>	3	13 (Schaffeten)	Gehirn Eihaut	nested-PCR: ITS1 nested-PCR: ITS1	7/13 8/13	54–62 %	(Howe et al., 2008)
	47	138 (Schaffeten)	Gehirn	nested-PCR: ITS1	18/138	13 %	(Howe et al., 2012)
<b>Schweiz</b>	1	20 (Schafaborte)	Gehirn	PCR: Nc5-Region	4/20	20 %	(Hässig et al., 2003)
<b>Spanien</b>	keine Angabe	74 (Schaffeten)	Gehirn	Histologie	8/74	11 %	(Moreno et al., 2012)
			Gehirn	nested-PCR: ITS1	5/74	7 %	
<b>Vereinigtes Königreich</b>	2	74 (Schaffeten)	Gehirn	PCR: Nc5-Region	14/74	19 %	(Hughes et al., 2006)



### III. PUBLIKATION

Die folgende Publikation

**“Comparative aspects of laboratory testing for the detection of *Toxoplasma gondii* and its differentiation from *Neospora caninum* as the etiologic agent of ovine abortion”**

wurde am 03. September 2020 von der Zeitschrift “Journal of Veterinary Diagnostic Investigation” zur Veröffentlichung angenommen.

**Article first published online:** October 7, 2020

**Issue published:** November 1, 2020

**Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2020, Vol. 32(6) 898–907**

© 2020 The Author(s)

DOI: 10.1177/1040638720962110

**Comparative aspects of laboratory testing for the detection of *Toxoplasma gondii* and its differentiation from *Neospora caninum* as the etiologic agent of ovine abortion**

**Nicola Meixner<sup>1,\*</sup>, Marie F. Sommer<sup>1</sup>, Nelly Scuda<sup>1</sup>, Kaspar Matiasek<sup>2</sup>, Matthias Müller<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Bavarian Health and Food Safety Authority, Erlangen, Germany

<sup>2</sup>Section of Clinical and Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

\*Corresponding author: Nicola Meixner, Bavarian Health and Food Safety Authority, Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen, Germany. [nicola.meixner@lgl.bayern.de](mailto:nicola.meixner@lgl.bayern.de)

Running head: Detection of *Toxoplasma gondii* infection in ovine abortions



## Abstract

Histologic examination of aborted material is an essential component in the diagnosis of ovine toxoplasmosis. However, the detection of *Toxoplasma gondii* in histologic sections, and its differentiation from the closely related protozoan *Neospora caninum*, is challenging. We developed a chromogenic in situ hybridization (ISH) assay for the identification of *T. gondii* in paraffin-embedded tissue samples. We examined retrospectively the archived placental tissue of 200 sheep abortion submissions for the presence of *T. gondii* by immunohistochemistry (IHC), ISH, and real-time PCR (rtPCR). All placental samples that tested positive for *T. gondii* by rtPCR (9 of 200) were also positive by IHC, with inconclusive IHC staining in an additional 7 rtPCR-negative cases. Further testing for *N. caninum* of all 200 placentas by rtPCR revealed 7 *Neospora*-positive cases. *T. gondii* ISH was positive in 4 of 9 IHC-positive samples and 1 of the 7 *N. caninum* rtPCR-positive samples. Real-time PCR was used as the reference standard for specificity and sensitivity calculations regarding placenta samples. Specificity of ISH and IHC was 99% and 96–100%, respectively. The sensitivity of ISH (44%) was quite low compared to IHC (100%). The exclusive use of ISH for the detection of *T. gondii*, and thus for the diagnosis of ovine toxoplasmosis, was not acceptable. However, combined with rtPCR, both ISH and IHC can be useful detection methods to improve histologic evaluation by visualizing the parasite within tissue sections.

**Key words:** immunohistochemistry; in situ hybridization; real-time PCR; sheep abortion; toxoplasmosis.

## Introduction

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite that infects a broad range of warm-blooded animals, including humans, worldwide.<sup>13,47</sup> Moreover, it has been recognized as one of the main causes of infectious ovine abortion in numerous countries worldwide.<sup>13</sup> Clinical ovine toxoplasmosis occurs following primary infection of a pregnant ewe as a result of the ingestion of sporulated oocysts.<sup>7,32</sup> Depending on the stage of pregnancy at which the ewe becomes infected, early embryonic death and resorption, mummification, abortion, stillbirth, or neonatal death may occur.<sup>13</sup>

To identify *T. gondii* as the causative agent in ovine abortions, histologic evaluation of fetal and placental tissue is an essential component of the pathology examination.<sup>34</sup> Therefore it is important to recognize the type of lesion caused by the parasite, given that it may be difficult to observe *T. gondii* stages (i.e., tachyzoites and tissue cysts) in hematoxylin and eosin (H&E)-stained tissue sections.<sup>13</sup> Characteristic lesions induced by *T. gondii* consist mainly of multifocal necrosis and mineralization with variable, predominantly nonsuppurative inflammation in placental cotyledons as well as multifocal necrosis and gliosis in the brain of the fetus.<sup>13,34</sup> However, similar lesions can also be observed in ovine abortions induced by *Neospora caninum*, a closely related cyst-forming apicomplexan parasite, and thus specific techniques are required to differentiate those 2 pathogens.<sup>5,6,14,31,37</sup>

Chromogenic in situ hybridization (ISH) targets specific nucleotide sequences and allows localization of organisms within microscopic lesions.<sup>38</sup> ISH has been used successfully to identify not only tissue stages of *T. gondii*<sup>35,41</sup> and other protozoa, but also a variety of other pathogenic agents.<sup>38</sup> However, to our knowledge, the method has not yet been reported for the detection of *T. gondii* in ovine abortion material.

Recognized methods for the identification of *T. gondii* in aborted fetuses and placental tissue are immunohistochemistry (IHC) and PCR.<sup>1,34</sup> IHC is valuable for the visualization of *T. gondii* stages and antigenic residues within ovine tissue sections, even in tissue exhibiting a degree of decomposition, which typically is present in abortion material.<sup>48</sup> Moreover, conventional and real-time PCR (rtPCR)-based assays have been developed for the detection of *T. gondii* in ovine abortions.<sup>22,23,29,39,42</sup> Although rtPCR has very high sensitivity and specificity for pathogen detection, in contrast to ISH or IHC, it does not provide information about the distribution of the pathogen in the infected tissue.

Our objective was to determine whether ISH is a practical test for the detection of *T. gondii* in histologic sections of placental tissue from field cases of ovine abortion. We compared ISH results to those obtained by standard methods (histopathology, IHC, and rtPCR) with respect to applicability, as well as diagnostic sensitivity and specificity, using rtPCR as the reference method. We also took into consideration *N. caninum* as an important differential causative agent in cases of ovine abortion.

## Materials and methods

### *Ovine abortions*

We performed our study retrospectively on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples from ovine abortions, stillbirths, or neonatal deaths submitted for autopsy to the Department of Veterinary Pathology of the Bavarian Health and Food Safety Authority (Erlangen, Germany) between 2003 and 2018. We examined 200 abortions in which FFPE placental tissue had at least one cotyledon, which yielded 151 abortion submissions with at least 1 corresponding fetus (e.g., twins or triplets), and 49 submissions of fetal membranes without fetus from 107 flocks in Bavaria (Germany). Each submission was considered a separate case.

Each case was subjected to a routine pathology examination at the time of submission, including macroscopic description and documentation of fetal crown-rump length. Furthermore, laboratory tests for the detection of abortifacient pathogens were conducted. Bacterial cultures of placenta and, if available, liver, kidney, lung, and stomach content, were performed in every case. For the detection of *Chlamydia* spp. and *Coxiella* spp., Stamp stains of placental smears (187 of 200), partly complemented by a rapid immunoassay for the detection of *Chlamydia* spp. antigen (123 of 200), and/or rtPCR (*Chlamydia* spp.: 35 of 200; *Coxiella* spp.: 47 of 200) were utilized. PCR was further used for the detection of viral agents (Schmallenberg virus, bluetongue virus, pestivirus) in 21 cases exhibiting pathologic changes indicating infection with those viruses. In cases exhibiting protozoal-like lesions, PCR or IHC were carried out for the detection of *N. caninum* or *T. gondii*, respectively.

All placental specimens were initially examined by IHC and ISH for the presence of *T. gondii* without respect to the diagnosis or histopathologic findings recorded in the autopsy report. Real-time PCR was performed afterward to verify IHC and ISH results. In *T. gondii*-positive cases, tissue sections of all available fetal organs were investigated histologically and examined by IHC and ISH for the presence of

*T. gondii* tissue stages. Moreover, the placental samples were examined by rtPCR for the presence of *N. caninum*, and available fetal organs were further examined histologically in positive cases.

#### ***Histopathology***

Tissue samples of placenta, and if available, fetal brain, lung, heart, skeletal muscle, and liver, were collected during autopsy, fixed in 10% neutral-buffered formalin, processed routinely, and sections stained with H&E for histologic examination.

#### ***IHC***

IHC was performed on deparaffinized and rehydrated 3- $\mu$ m tissue sections using a rabbit anti-*T. gondii* polyclonal antibody (BioGenex) in 1:1,000 dilution, incubated overnight. The primary polyclonal antibody that we used had been utilized in previous studies for the detection of *T. gondii* on FFPE placenta sections.<sup>27,45,46</sup> The staining was carried out at room temperature, and washing steps between incubation times were performed with a Tris-based washing buffer (DCS Diagnostics). Before labeling, antigen retrieval was performed (Protease XXIV; BioGenex) for 10 min and, to prevent background staining, the slides were incubated with a blocking reagent (DCS Diagnostics) for 8 min. Bound primary antibody was detected with an anti-rabbit/anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated polymer detection system (PermaRed chromogen, SuperVision Red 2 AP kit; DCS Diagnostics). Finally, the slides were counterstained with Mayer hematoxylin for examination by light microscopy.

#### ***ISH***

*Probe design.* Two oligonucleotide probes targeting the 18S and the 28S ribosomal RNA (rRNA) for the detection of *T. gondii* were designed based on homology studies on all available GenBank sequences of both *T. gondii* rRNA genes. The following sequences complementary to regions of complete homology among *T. gondii* were selected as probe sequences: 5'-CCACACAATGAAGTGTGGAGAAATCCAGAA GG-3' (18S rRNA) and 5'-ACAAGTCAACAGCTCGGAAAGAGCAGTTG-3' (28S rRNA). Both probe sequences were further submitted to BLAST analysis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to check for homologies with other closely related cyst-forming coccidia and to exclude unintentional cross-reactivity with other organisms. There was no nucleotide mismatch to the corresponding 18S rRNA gene

sequence of *Hammondia hammondi* and 1 mismatch to the 18S rRNA gene sequence of *N. caninum* and *Hammondia heydorni*; there were 1, 2 and 3 mismatches to the corresponding 28S rRNA gene sequence of *H. hammondi*, *H. heydorni* and *N. caninum*, respectively. Therefore, cross-hybridization could not be ruled out completely by in silico analysis. With other closely related protozoa, such as *Besnoitia besnoiti*, there were 5 or more mismatches to corresponding gene sequences, which was considered to be an adequate difference to prevent cross-hybridization. Moreover, both *Besnoitia* spp. and *Hammondia* spp. are not considered to be relevant causes of disease or abortion in sheep.<sup>16,21</sup> Thus, we evaluated the specificity of both ISH probes in situ only for *N. caninum* as a potential differential etiology. We evaluated the specificity of those ISH probes on canine brain tissue containing *N. caninum* tissue cysts; no cross-reactivity was found. The sensitivity of the oligonucleotide probes was validated in situ by staining PCR- and IHC-positive tissue sections of a squirrel monkey liver and lung containing numerous developmental stages of *T. gondii*. To achieve a staining intensity comparable to IHC, a combination of both ISH probes was used.

*ISH.* ISH was performed based on a protocol described previously,<sup>9</sup> with slight modifications. Except for the hybridization step, the staining was carried out at room temperature. Briefly, 3- $\mu$ m FFPE sections were deparaffinized and rehydrated. Proteolytic treatment was performed (Protease XXIV; BioGenex) for 10 min. The slides were rinsed with distilled water, dehydrated in ethanol, and air-dried. Hybridization mixture (100  $\mu$ L) composed of 50  $\mu$ L of deionized formamide (AppliChem), 20  $\mu$ L of 20 $\times$  standard sodium citrate (SSC), 11  $\mu$ L of distilled water, 10  $\mu$ L of dextran sulfate (50%, w/v; Carl Roth), 5  $\mu$ L of herring sperm DNA (50  $\mu$ g/mL; Invitrogen), 2  $\mu$ L of Denhardt solution (50 $\times$ ; AppliChem), and 1  $\mu$ L of each of the two 3'-end digoxigenin-labeled *T. gondii* probes (Eurofins Genomics) at a concentration of 1  $\mu$ g/ $\mu$ L, was applied on the slides and covered with a coverslip. The slides were incubated at 95°C for 6 min and then placed in an incubator at 40°C overnight for hybridization. On the second day, the sections were stringently washed sequentially in 2 $\times$  SSC, 1 $\times$  SSC, and 0.1 $\times$  SSC (10 min each). Hybridized probes were detected by incubating the slides with anti-digoxigenin-alkaline phosphatase Fab fragments (1:100; Roche Diagnostics) for 60 min. After washing in Tris-buffered saline (TBS; pH 7.5), the binding of Fab fragments was visualized by using the color

substrates BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) and NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride; Roche Diagnostics), for 60 min in the dark. Levamisole was added to avoid nonspecific alkaline phosphatase activity. The staining reaction was stopped by placing the slides in Tris-EDTA buffer (pH 8.0) for 10 min. Finally, the slides were counterstained with Mayer hematoxylin and mounted under coverslips using an aqueous mounting medium (Aquatex; Merck) for examination by light microscopy.

Tissue of a squirrel monkey liver containing numerous parasite tachyzoites that tested positive for *T. gondii* by rtPCR was used as a positive control for IHC and ISH.

#### ***DNA extraction and rtPCR***

Four-to-8 sections, 5- $\mu$ m thick, from the FFPE placental tissue of each case were placed separately into 1.5-mL tubes. To avoid DNA contamination during collection, the microtome was cleaned and decontaminated (Sagrotan Schimmelfrei; Reckitt Benckiser),<sup>20</sup> and microtomic blades were changed between cases. Following the manufacturer's instructions, the FFPE sections were deparaffinized with xylol and ethanol. DNA was isolated (DNeasy blood and tissue kit; Qiagen). To increase the yield, purified DNA was eluted with 100  $\mu$ L of elution buffer. *T. gondii*-negative ruminant FFPE tissue samples were included as sample processing controls in each extraction run.

The extracted DNA was amplified (ID Gene *Toxoplasma gondii* duplex; IDvet) targeting the *BI* gene for the detection of *T. gondii*. PCR was performed in a total volume of 13  $\mu$ L with 8  $\mu$ L of master mix and 5  $\mu$ L of DNA. A thermocycler (LightCycler 96; Roche Diagnostics) was used with the following cycling conditions: 95°C for 10 min, and 40 cycles of a 2-step PCR consisting of 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. Each amplification run included *T. gondii* DNA as positive control template and water as negative control template.

For the detection of *N. caninum*, samples were analyzed by rtPCR as described previously.<sup>10</sup> Primers and probe were synthesized commercially (Eurofins Genomics). The reaction mixture (25  $\mu$ L) contained 5  $\mu$ L of extracted DNA, 800 nM of each primer, 100 nM of TaqMan probe, and 12.5  $\mu$ L of commercial master mix (QuantiTect probe PCR kit; Qiagen). The amplification program included an initial activation step at 95°C for 15 min, followed by 45 cycles of denaturation at 94°C for 15 s, and annealing at 60°C for 60 s.

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was performed using the computing environment R (v.3.5.1; <https://www.r-project.org>). Sensitivity, specificity, and predictive values, including their 95% CIs, were calculated for IHC and ISH using rtPCR as the reference method. The agreement between IHC and PCR and between ISH and PCR was evaluated using the Cohen kappa statistic.<sup>49</sup>

## **Results**

### ***Detected pathogens associated with ovine abortions***

A potential abortion-inducing infectious agent was identified in 123 of 200 (61.5%) cases (Table 1). Among them, 8 exhibited double infections. There was no evidence of immunosuppression in those cases. In one case, coinfection by *Chlamydia* spp. and *T. gondii*, and in 2 cases, coinfection by *Chlamydia* spp. and *N. caninum*, was present. In the other 5 cases, coinfection by 2 different bacterial agents was present.

### ***Examination of ovine abortions with special emphasis on *T. gondii****

Positive results were obtained in 10 of 200 examined placental samples with at least 1 of the utilized methods for the detection of *T. gondii* (Table 2). However, infection with *T. gondii* was confirmed in only 9 of those 10 cases by the reference method (rtPCR), whereas the last remaining case tested positive for *N. caninum* by rtPCR.

According to the autopsy reports, 1 of 9 *T. gondii*-positive submissions exhibited characteristic gross lesions consisting of small, yellow-white foci of necrosis within placental cotyledons. None of the corresponding fetuses had any specific macroscopic alteration.

Histologically, variable multifocal necrotizing placentitis with some areas of dystrophic mineralization was observed in the cotyledons of all 9 *T. gondii*-positive placentas (Fig. 1A, 1B). Characteristic protozoal lesions (multifocal necrosis and gliosis; Fig. 1C) were found in the brains of 6 of 8 corresponding fetuses. In other fetal tissue samples (heart, lung, liver, and skeletal muscle), no inflammatory changes indicating a protozoal infection were observed (Table 3). Furthermore, no tissue cysts or tachyzoites were seen in any H&E-stained tissue sections.

All 9 placental samples that tested positive for *T. gondii* by rtPCR were also positive by IHC (Table 2). Positive immunohistochemical labeling detected a large

amount of *T. gondii* antigen, identifiable by distinct, pink-red staining, primarily associated with areas of focal necrosis within the placental cotyledons (Fig. 1D). Tachyzoite-like, round-to-oval structures, were detected singly or in clusters. In intact organisms, especially in tachyzoite clusters, a fine granular structure could be observed. In the more well-preserved tissue sections, tachyzoites were located intracellularly in trophoblast cells in areas with largely intact placental structure (Fig. 1E). In several of the 200 abortion cases, nonspecific background staining was detected, especially in degenerate or in peripheral areas of the IHC-stained placental sections, and an interpretation could not be made with certainty, leaving 7 cases questionable by IHC (Table 2). None of these cases were positive by rtPCR for either *T. gondii* or *N. caninum*. Single-to-multiple *T. gondii* tissue cysts were detected by IHC in lung tissue of 1 fetus and heart tissue of 2 infected fetuses (Table 3).

Four of 9 placental samples that tested positive for *T. gondii* by rtPCR and IHC were also positive by ISH (Table 2). Moreover, one positive ISH result was obtained in a placental sample that was neither detected by *T. gondii* rtPCR nor by *T. gondii* IHC staining, but was found to be positive for *N. caninum* by rtPCR. Positive hybridization was characterized by dark-brown to purple staining of tachyzoite-like structures, singly or in clusters. Stained organisms were rarely associated with necrotic foci, but rather could be observed in mostly well-preserved areas within the placental cotyledon, especially in the trophoblast layer (Fig. 1F). Nonspecific background staining in placental tissue was almost absent using ISH. Single-to-multiple *T. gondii* tissue cysts were detected by ISH in the liver tissue of 1 fetus and heart tissue of 2 infected fetuses (Table 3).

*T. gondii* DNA was identified in 9 of 200 ovine placental samples by rtPCR (Table 2). Further, the presence of *T. gondii* was confirmed by rtPCR by an external laboratory (CVUA, Karlsruhe, Germany) in these cases. All 9 *T. gondii*-positive samples were negative for *N. caninum* by PCR. For IHC, the sensitivity was 100% (95% CI: 66–100%), and the specificity was 96–100% (95% CI: 93–99% and 98–100%). For ISH, the sensitivity and specificity were 44% (95% CI: 14–79%) and 99% (95% CI: 97–100%), respectively (Table 4).

### ***PCR detection of N. caninum in ovine abortions***

To confirm the specificity of the detection of *T. gondii* by rtPCR and to exclude cross-reactivity of the utilized primary antibody for IHC and ISH probes with *N. caninum*,



all placental samples were further examined for the presence of genome of *N. caninum* by PCR. *N. caninum* DNA was detected by rtPCR in 7 of 200 placental samples (Table 1). According to the autopsy reports, one of these cases had small, yellow-white foci of necrosis within placental cotyledons. Microscopically, multifocal necrotizing placentitis was observed in the cotyledons of all but one placental sample. In 3 cases, fetal brain tissue was available and suitable for further examination, each with characteristic protozoal lesions (Fig. 2A). Furthermore, multifocal, mixed inflammatory cell myocarditis was found in 2 corresponding fetuses (Fig. 2B). IHC staining for the detection of *T. gondii* was negative in every *N. caninum*-positive placenta. As noted above, a positive result was obtained by ISH in one of these placental samples.

## Discussion

We detected no *T. gondii* stages in any H&E-stained tissue sections, neither in fetal membranes nor in fetal organs. Similar results were described previously; *T. gondii* was recognized only infrequently in H&E-stained tissue sections of both field outbreaks of toxoplasmic abortion and experimentally infected ovine fetuses.<sup>24,48</sup> These findings might be explained by uneven distribution and poor detectability of *T. gondii* organisms in fetal tissue, particularly in distinguishing between tachyzoites and cell debris in placental tissue.<sup>13</sup> Therefore, the focus of histologic examination should be the detection of characteristic tissue lesions for the diagnosis of *T. gondii*-induced abortion.<sup>13</sup> However, in accordance with previous studies,<sup>5,6,14,31,37</sup> lesions in ovine fetuses and fetal membranes induced by *T. gondii* were quite similar to those caused by *N. caninum*. Multifocal necrotizing placentitis compatible with a protozoal infection was present in the placental cotyledons of almost every one of our protozoan-associated abortion cases (15 of 16). Characteristic lesions, marked as focal-to-multifocal necrosis and/or gliosis, were observed most frequently in available brain tissue of fetuses associated with *T. gondii* (6 of 8) and *N. caninum* (3 of 3). Although protozoan-associated lesions in fetal organs (excluding brain) were described more frequently in fetuses infected with *T. gondii*,<sup>37</sup> we observed multifocal myocarditis exclusively in the heart tissue of 2 fetuses infected with *N. caninum*. These findings support the need for a method that is able to differentiate between the 2 protozoan parasites.

An accurate diagnosis and thus the distinction between these 2 agents is especially important for both epidemiologic and prophylactic reasons; only *T. gondii* is considered to be of zoonotic importance.<sup>15,47</sup> The parasites have different definitive hosts,<sup>15,47</sup> which is important regarding effective preventive measures. Moreover, a commercial vaccine is available only for ovine toxoplasmosis.<sup>4</sup>

According to a study of experimentally infected fetuses, IHC is sensitive and specific for the detection of *T. gondii* in ovine fetuses and fetal membranes.<sup>48</sup> In a study from Germany, IHC appeared even more sensitive than conventional PCR for the detection of *T. gondii* in abortions of sheep.<sup>42</sup> We detected *T. gondii* antigen most consistently in placental cotyledons of infected fetuses, and thus found a sensitivity of 100% (95% CI: 66–100%) by IHC. In line with previous results, large amounts of *T. gondii* antigen were usually present, predominantly within the necrotic foci of placental cotyledons.<sup>46,48</sup> This may be explained by the fact that *T. gondii* initially settles and multiplies in placentomes of the gravid uterus before spreading to the fetus.<sup>3,24</sup> Using rtPCR for the quantification of *T. gondii* in ovine maternal and fetal tissues from experimentally infected ewes, placenta has been demonstrated to be positive from the earliest time post-infection and contains the highest load of *T. gondii* genome.<sup>23</sup> This might explain why placental tissue is superior to fetal tissue for the detection of *T. gondii* by IHC, as demonstrated in our study. In contrast to placental tissue, *T. gondii* was detected only sporadically in fetal heart (2 of 7) and lung tissue (1 of 9). No developmental stages of *T. gondii* were visualized in brain tissue by IHC.

Despite the high sensitivity of IHC (100%; 95% CI: 66–100%), specificity (96–100%; 95% CI: 93–99% and 98–100%) appeared lower compared to rtPCR, which was used as the reference method. Given the common nonspecific background staining in placental tissue, microscopic evaluation was hampered in several cases and thus 7 of 200 examined cases could not be assessed as positive or negative. A variety of factors may affect IHC staining, including technical aspects, such as processing of tissue specimens, the utilized detection system, or the interaction of primary antibody.<sup>2</sup> Furthermore, the type of tissue investigated may have a great influence. Diffuse nonspecific background staining, as well as staining of plant debris and placental pigments, have been described previously in IHC-stained ovine placenta sections screened for *Coxiella burnetii*.<sup>11</sup> Another reason for background staining in IHC is necrosis of the investigated tissue.<sup>8</sup> Thus, the distinction between nonspecific necrosis-associated staining and staining truly induced by antigen of degenerate

*T. gondii* organisms was challenging in our study. This fact is a relevant disadvantage for IHC screening of placental tissue for the detection of *T. gondii* given that aborted placental tissue is marked by autolysis and necrotic alterations in many cases.

Contrary to previous investigations using another commercial anti-*T. gondii* polyclonal antibody,<sup>43</sup> we observed no cross-reactivity with tissue stages of *N. caninum* in cotyledons of *N. caninum*-positive placental samples. This implies species specificity of the anti-*T. gondii* primary antibody utilized in our study.

To our knowledge, evaluation of ISH has not been reported previously on the tissue of aborted ovine fetuses for the detection of *T. gondii*. Because placental tissue appears well suited for the identification of the protozoan parasite by IHC, we tested its use for ISH. Yet, a true positive result was gained in less than half (4 of 9) of the abortion cases infected with *T. gondii* by ISH. This resulted in substantially lower sensitivity of ISH (44%; 95% CI: 14–79%) compared to IHC (100%; 95% CI: 66–100%). Given that extensive tissue necrosis was supposed to lead to reduced or even absent ISH signal in previous investigations,<sup>26,36</sup> the necrotic foci in the placental cotyledons may be the most reasonable explanation for false-negative results obtained by ISH. Necrotic tissue might interfere with nucleic acid hybridization and might inhibit the development of a visible signal.<sup>26</sup> Furthermore, tissue degradation, which frequently occurs in placental tissue, might cause a release of endogenous nucleases, destroying nucleic acid and thus preventing hybridization with the oligonucleotide probes.<sup>26</sup> However, antigen (e.g., of the parasite surface) may remain detectable by IHC. False-negative ISH results might also be explained by the fact that only viable, and therefore intact, organisms could be detected by the ISH method that we used, as a result of declining levels of rRNA after cell death.<sup>35,51</sup> Therefore, it is advisable to fix tissue specimens as soon as possible to prevent further postmortem decay.

Intact ISH-stained organisms were found predominantly in relatively normal areas of placental cotyledons and fetal organs. These results suggest that our ISH procedure may be an efficient tool for the detection of *T. gondii* in well-preserved and unaltered tissue specimens. This, of course, limits its use in the diagnosis of ovine toxoplasmosis.

One of the most significant advantages of ISH is its high specificity, which has been demonstrated to be 100% in previous studies investigating fungi, viral agents, and protozoa other than *T. gondii*.<sup>25,26,33,40</sup> In our study, the specificity of ISH was 99% (95% CI: 97–100%). Although contrary to IHC, nonspecific background staining

was nearly absent in ISH-stained tissue sections, ISH revealed a false-positive result when utilized on the placental cotyledons of 1 of 7 *N. caninum*-positive cases. The false-positive result implies cross-hybridization of at least 1 of the 2 oligonucleotide probes. This is explainable given the high homology of the 18S rRNA gene sequences of *T. gondii* and *N. caninum*,<sup>18,28,30</sup> and therefore this oligonucleotide probe shows only a single nucleotide variation. Hence, a second probe, targeting the 28S rRNA sequence—still highly similar<sup>19</sup>—with a maximum of 3 mismatches, was additionally chosen for the possible differentiation of both species. However, the validation process showed that only the combination of both probes provided sufficient signal intensity.

Although it is possible that the high homology of both rRNA sequences causes cross-reactivity, we chose this locus because rRNA is supposedly the only target present in sufficient abundance to warrant effective ISH staining of protozoal cells.<sup>12</sup> Nevertheless, verifying the specificity of both probes in situ by staining brain tissue infected with *N. caninum* has shown no cross-hybridization. In those sections, mainly tissue cysts of *N. caninum* were detected, which typically have decelerated replication. As previously hypothesized for slowly replicating stages of other protozoa, protein synthesis takes place to a lesser extent in those persistent stages and thus rRNA content is lower, resulting in a weaker or even absent signal.<sup>44</sup> Further investigations of *N. caninum*-positive tissue samples containing a high amount of fast-replicating stages (tachyzoites) are necessary to definitively determine whether the ISH procedure established in our study can distinguish *T. gondii* from *N. caninum*.

According to our results, both IHC and ISH can be useful additional techniques to improve the detection of *T. gondii* by visualizing developmental stages in tissue sections. However, because of its low sensitivity, ISH should be used in combination with other detection methods. Although the specificity of both ISH probes was not clarified, our results suggest that our ISH procedure might be inappropriate for the differentiation between *T. gondii* and *N. caninum*. Nevertheless, the morphologic evaluation of ISH-stained tissue sections is less challenging compared to IHC given the absence of background staining. Real-time PCR is considered a very sensitive and suitable tool for the detection of *T. gondii* in ovine abortion material, especially in placental cotyledons.<sup>23</sup> Furthermore, the rtPCR method that we used was very specific with regard to the distinction between *T. gondii* and *N. caninum*. Moreover, using commercial PCR test kits, rtPCR is comparatively simple and fast to implement in

any PCR laboratory. However, the use of a highly sensitive test such as PCR to determine infectious agents as the cause of small ruminant abortion does not distinguish between infection and disease causation.<sup>27</sup> *T. gondii* DNA has been detected in placental tissue of congenitally infected but apparently healthy live-born lambs by PCR.<sup>17,50</sup> Despite the detection of *T. gondii* in abortion cases, the causative agent might remain uncertain, especially if another abortifacient pathogen is identified. Similar to previous investigations,<sup>27,45</sup> our study revealed one double infection with *Chlamydia* spp. and *T. gondii*. Therefore, a positive PCR test should be interpreted in conjunction with other testing as well as gross and histologic examination. Factors influencing PCR interpretation include history and supportive lesions as well as identification and exclusion of other pathogens using bacterial culture and smears, viral PCR testing, and IHC.

### **Acknowledgments**

We thank Dana Schleinitz, Helmut Puchta, and Thomas Neuß for their excellent technical advice and assistance regarding histologic and molecular methods. Furthermore, we highly appreciate the support of Dr. Monir Majzoub-Altweck, Dr. Elisabeth Kemter, and Gudrun Goldmann of the Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany with the establishment of the ISH technique utilized in our study.

### **Declaration of conflicting interests**

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

### **Funding**

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

## References

1. Borel N, et al. Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. *Vet J* 2014;200:218–229.
2. Bussolati G, Leonardo E. Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry. *J Clin Pathol* 2008;61:1184–1192.
3. Buxton D, Finlayson J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. *J Comp Pathol* 1986;96:319–333.
4. Buxton D, Innes EA. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 1995;110(Suppl 1):S11–S16.
5. Buxton D, et al. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *J Comp Pathol* 1997;117:1–16.
6. Buxton D, et al. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J Comp Pathol* 1998;118:267–279.
7. Buxton D, et al. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. *Vet Parasitol* 2007;149:25–28.
8. Cartun RW, et al. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. In: Dabbs DJ, ed. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications*. 5th ed. Elsevier, 2019:1–46.
9. Chvala S, et al. *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser* f. *domestica*) detected by in-situ hybridization. *J Comp Pathol* 2006;134:211–218.
10. Constantin EM, et al. Untersuchungen zur Rolle des Rotfuchses (*Vulpes vulpes*) als möglicher Endwirt von *Neospora caninum* [Studies on the role of the red fox (*Vulpes vulpes*) as a potential definitive host of *Neospora caninum*]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2011;124:148–153. German.
11. Dilbeck PM, McElwain TF. Immunohistochemical detection of *Coxiella burnetii* in formalin-fixed placenta. *J Vet Diagn Invest* 1994;6:125–127.
12. Dinhopl N, et al. Application of in-situ hybridization for the detection and identification of avian malaria parasites in paraffin wax-embedded tissues from captive penguins. *Avian Pathol* 2011;40:315–320.
13. Dubey JP. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2nd ed. CRC Press, 2010.
14. Dubey JP, Lindsay DS. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J Vet Diagn Invest* 1990;2:230–233.

15. Dubey JP, et al. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 2007;20:323–367.
16. Dubey JP, Sreekumar C. Redescription of *Hammondia hammondi* and its differentiation from *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 2003;33:1437–1453.
17. Duncanson P, et al. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. Int J Parasitol 2001;31:1699–1703.
18. Ellis J, et al. The phylogeny of *Neospora caninum*. Mol Biochem Parasitol 1994;64:303–311.
19. Ellis JT, et al. Comparison of the large subunit ribosomal DNA of *Neospora* and *Toxoplasma* and development of a new genetic marker for their differentiation based on the D2 domain. Mol Cell Probes 1998;12:1–13.
20. Fischer M, et al. Efficacy assessment of nucleic acid decontamination reagents used in molecular diagnostic laboratories. PloS One 2016;11:e0159274.
21. Gutierrez-Exposito D, et al. Absence of antibodies specific to *Besnoitia* spp. in European sheep and goats from areas in Spain where bovine besnoitiosis is endemic. Parasitol Res 2017;116:445–448.
22. Gutierrez J, et al. Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of toxoplasmosis and enzootic abortion of ewes. J Vet Diagn Invest 2012;24:846–854.
23. Gutierrez J, et al. Detection and quantification of *Toxoplasma gondii* in ovine maternal and foetal tissues from experimentally infected pregnant ewes using real-time PCR. Vet Parasitol 2010;172:8–15.
24. Hartley WJ, Kater JC. The pathology of *Toxoplasma* infection in the pregnant ewe. Res Vet Sci 1963;4:326–336.
25. Hayden RT, et al. In situ hybridization for the differentiation of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Pseudallescheria* species in tissue section. Diagn Mol Pathol 2003;12:21–26.
26. Hayden RT, et al. In situ hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue section. Diagn Mol Pathol 2001;10:15–23.
27. Hazlett MJ, et al. A prospective study of sheep and goat abortion using real-time polymerase chain reaction and cut point estimation shows *Coxiella burnetii* and *Chlamydophila abortus* infection concurrently with other major pathogens. J Vet Diagn Invest 2013;25:359–368.

28. Holmdahl OJ, et al. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. FEMS Microbiol Lett 1994;119:187–192.
29. Hurtado A, et al. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. Vet Parasitol 2001;102:17–27.
30. Jenkins MC, et al. The relationship of *Hammondia hammondi* and *Sarcocystis mucosa* to other heteroxenous cyst-forming coccidia as inferred by phylogenetic analysis of the 18S SSU ribosomal DNA sequence. Parasitology 1999;119:135–142.
31. McAllister MM, et al. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. Vet Pathol 1996;33:647–655.
32. McColgan C, et al. Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. Vet Rec 1988;123:467–470.
33. Menezes RC, et al. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. J Clin Microbiol 2013;51:206–211.
34. Moeller RB Jr. Disorders of sheep and goats. In: Njaa BL, ed. Kirkbride's Diagnosis of Abortion and Neonatal Loss in Animals. 4th ed. Wiley-Blackwell, 2012:49–87.
35. Montone KT. In situ hybridization for ribosomal RNA sequences: a rapid sensitive method for diagnosis of infectious pathogens in anatomic pathology substrates. Acta Histochem Cytochem 1994;27:601–606.
36. Montone KT, et al. In situ hybridization for specific fungal organisms in acute invasive fungal rhinosinusitis. Am J Clin Pathol 2011;135:190–199.
37. Moreno B, et al. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. Vet Parasitol 2012;187:312–318.
38. Mostegl MM, et al. Influence of prolonged formalin fixation of tissue samples on the sensitivity of chromogenic in situ hybridization. J Vet Diagn Invest 2011;23:1212–1216.
39. Owen MR, et al. Diagnosis of toxoplasma abortion in ewes by polymerase chain reaction. Vet Rec 1998;142:445–448.
40. Pennick KE, et al. Diagnostic sensitivity and specificity of in situ hybridization and immunohistochemistry for Eastern equine encephalitis virus and West



- Nile virus in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue of horses. J Vet Diagn Invest 2012;24:333–338.
41. Schoondermark-van de Ven E, et al. Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by molecular detection. In: Smith JE, ed. Toxoplasmosis. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology). Vol. 78. Springer, 1993:199–207.
  42. Steuber S, et al. Der Nachweis von *Toxoplasma gondii* in Abortgeweben vom Schaf mittels der Polymerase-Kettenreaktion [The detection of *Toxoplasma gondii* in abortion tissues of sheep using the polymerase chain reaction]. Dtsch Tierarztl Wochenschr 1995;102:91–93. German.
  43. Sundermann CA, et al. Immunohistochemical diagnosis of *Toxoplasma gondii*: potential for cross-reactivity with *Neospora caninum*. J Parasitol 1997;83:440–443.
  44. Susta L, et al. An in situ hybridization and immunohistochemical study of cytauxzoonosis in domestic cats. Vet Pathol 2009;46:1197–1204.
  45. Szeredi L, Bacsadi A. Detection of *Chlamydophila (Chlamydia) abortus* and *Toxoplasma gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by the streptavidin-biotin method. J Comp Pathol 2002;127:257–263.
  46. Szeredi L, et al. Epidemiological and pathological study on the causes of abortion in sheep and goats in Hungary (1998–2005). Acta Vet Hung 2006;54:503–515.
  47. Tenter AM, et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 2000;30:1217–1258.
  48. Uggl A, et al. Immunohistochemical diagnosis of toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. Am J Vet Res 1987;48:348–351.
  49. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. Fam Med 2005;37:360–363.
  50. Williams RH, et al. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. Parasitology 2005;130:301–307.
  51. Xie YX, et al. Determination of RNA content in postischemic gerbil brain by in situ hybridization. Metab Brain Dis 1989;4:239–251.

**Table 1.** Detected abortifacient agents in ovine abortions, 2003–2018.

Detected abortifacients	No. of positive cases*	Positive cases (%)
Infectious†	123 (200)‡	61.5
Bacterial	113 (200)	56.5
<i>Chlamydia</i> spp.	84	42
<i>Coxiella</i> spp.	8	4
<i>Campylobacter</i> spp.	5	2.5
<i>Listeria</i> spp.	2	1
<i>Salmonella</i> spp.	1	0.5
Other bacteria	13	6.5
Viral	2 (21)§	9.5
Parasitic	16 (200)	8
<i>Toxoplasma gondii</i>	9	4.5
<i>Neospora caninum</i>	7	3.5
Unknown‡	77 (200)	38.5

\* Numbers in parentheses are the number of cases examined.

† Cases with an etiologic diagnosis.

‡ Eight cases with multiple pathogens identified.

§ Only 18 of these cases were tested for Schmallenberg virus (SBV), 4 for pestivirus, and 2 for bluetongue virus. Infection with SBV was detected in 2 cases.

‡ Cases in which no specific abortion-inducing infectious agent was detected; includes 36 cases with placentitis, indicating an infectious cause.

**Table 2.** Comparison of immunohistochemistry (IHC), in situ hybridization (ISH), and real-time PCR (rtPCR) for the detection of *Toxoplasma gondii* in ovine placental tissue.

Case	Placenta		
	IHC	ISH	rtPCR
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	–	+
6	+	–	+
7	+	–	+
8	+	–	+
9	+	–	+
10*	–	+	–
11–17	±	–	–

+ = positive test result; – = negative test result; ± = inconclusive test result.

\* Case tested positive for *Neospora caninum* by rtPCR.

**Table 3.** Results of histologic examination, immunohistochemistry (IHC), and in situ hybridization (ISH) in *Toxoplasma gondii*-positive ovine fetuses.

Case	Brain			Heart			Lung			Liver			Skeletal muscle		
	H&E	IHC	ISH	H&E	IHC	ISH	H&E	IHC	ISH	H&E	IHC	ISH	H&E	IHC	ISH
1	+	–	–	ND	ND	ND	–	–	–	ND	ND	ND	–	–	–
2	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	+	–	–	–	–	+	–	–	–	ND	ND	ND	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–	–	+	–	ND	ND	ND	–	–	–
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	–	–	–	–	–	–	ND	ND	ND
7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	+	–	–	–	+	–	–	–	–	ND	ND	ND	–	–	–
9	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	ND	ND	ND

H&E = hematoxylin and eosin (+ = presence of protozoal-associated lesions; – = absence of protozoal-associated lesions); ND = not done and/or tissue not available. IHC, ISH: + = visualization of *T. gondii* tissue cysts without corresponding inflammation; – = negative.

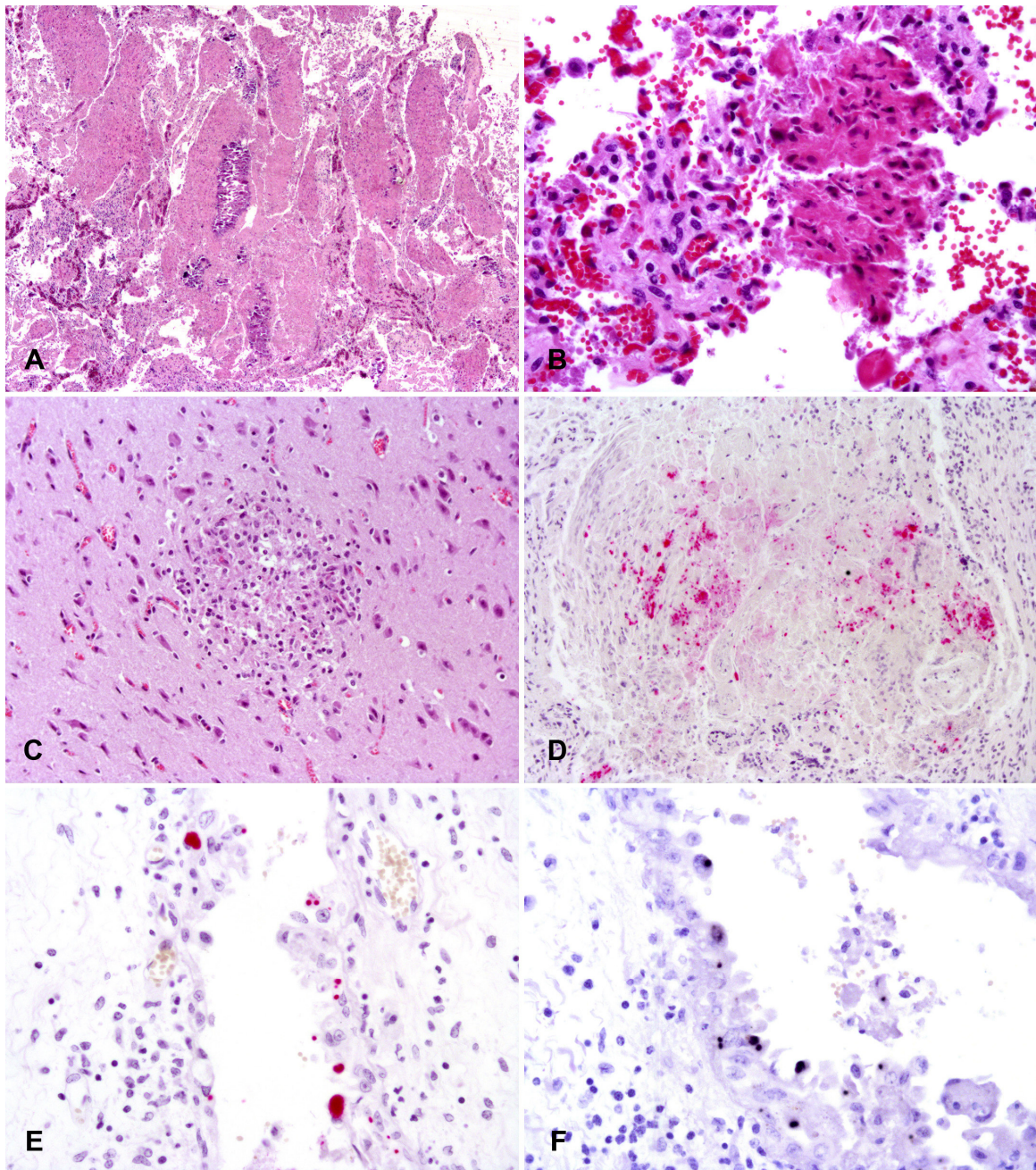
**Table 4.** Sensitivity, specificity, predictive values, and kappa values of immunohistochemistry (IHC) and in situ hybridization (ISH) for the detection of *Toxoplasma gondii* in placental tissue using real-time PCR (rtPCR) as reference method.

	IHC	ISH
Sensitivity (%)	100 (66–100)	44 (14–79)
Specificity (%)	96 (93–99)*–100 (98–100)†	99 (97–100)
PPV (%)	56 (30–80)*–100 (66–100)†	80 (28–99)
NPV (%)	100 (98–100)	97 (94–99)
Kappa value	0.70*–1†	0.56

NPV = negative predictive value; PPV = positive predictive value. Numbers in parentheses are 95% confidence intervals.

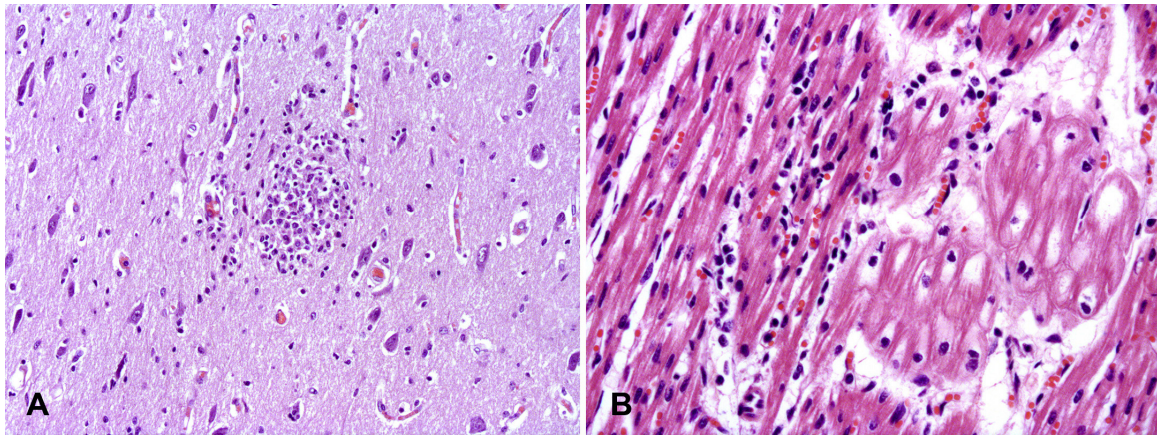
\* On the assumption that all cases with inconclusive IHC staining were assessed incorrectly as “positive” (referring to rtPCR as reference standard).

† On the assumption that all cases with inconclusive IHC staining were assessed correctly as “negative” (referring to rtPCR as reference standard).



**Figure 1.** Histologic sections of aborted ovine fetuses and placental tissue infected with *Toxoplasma gondii*. **A.** Severe multifocal necrotizing placentitis in a cotyledon with some central dystrophic mineralization in the necrotic foci. H&E. **B.** Small focus of necrosis next to largely well-preserved ovine placental tissue. H&E. **C.** Necrotic focus surrounded by gliosis in the cerebral white matter of an aborted ovine fetus. H&E. **D.** Immunostained *T. gondii* antigen (red) associated with a necrotic focus in the ovine placenta. **E.** Detection of individual *T. gondii* tachyzoites and tachyzoite clusters (red) in the trophoblast layer of ovine placenta by immunohistochemistry. **F.** Detection of individual *T. gondii* tachyzoites and tachyzoite clusters (dark brown) in the trophoblast layer of ovine placenta by chromogenic in situ hybridization.





**Figure 2.** Aborted ovine fetuses infected with *Neospora caninum*. **A.** Focal gliosis in the cerebral gray matter (cortex) of an aborted ovine fetus. H&E. **B.** Mild multifocal myocarditis in an aborted ovine fetus. H&E.



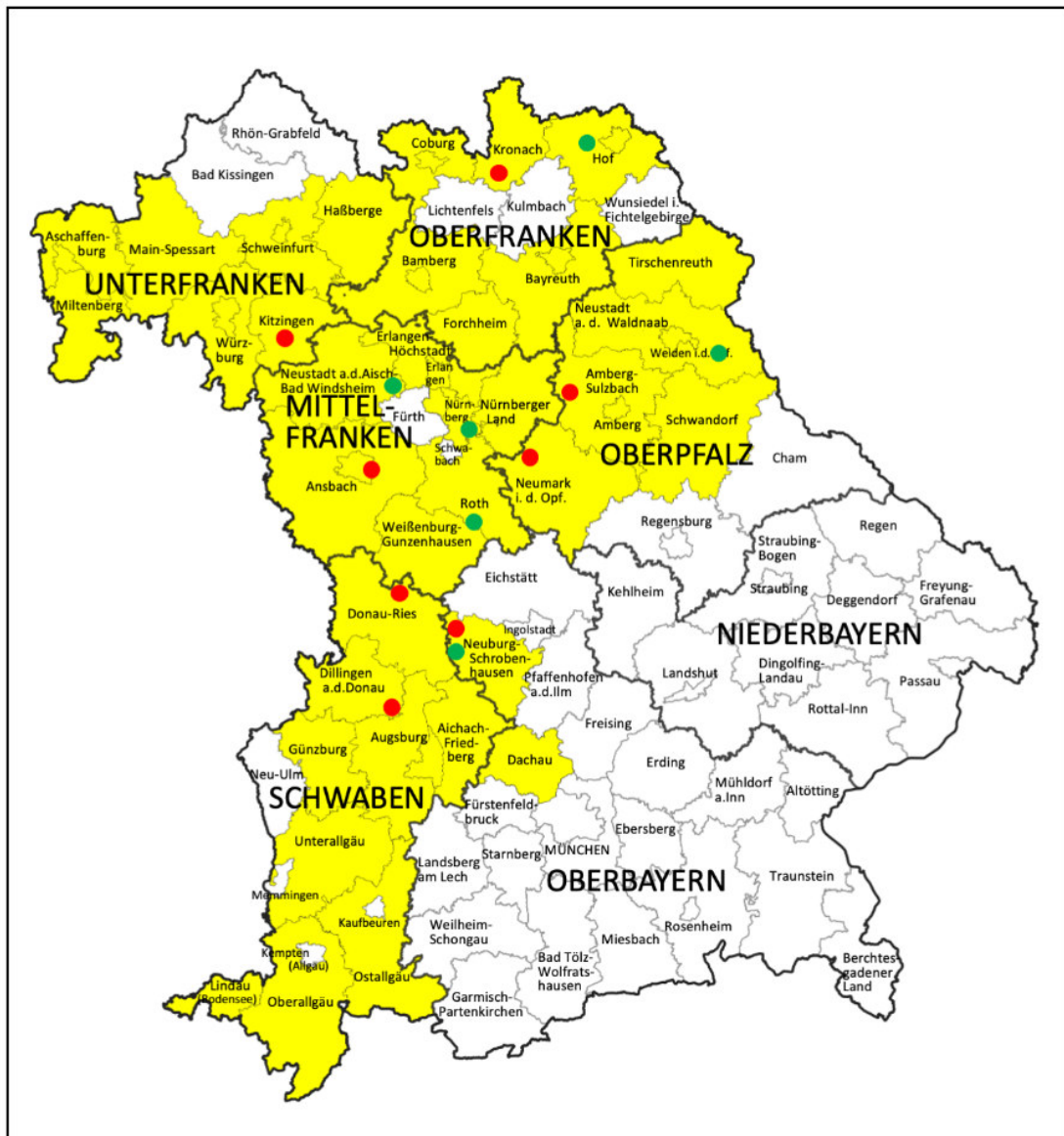


## IV. WEITERE ERGEBNISSE

Das Untersuchungsgut der vorliegenden Arbeit stammt aus dem Einzugsgebiet des LGL in Erlangen. Hierzu zählt in erster Linie der nordbayerische Raum (Oberfranken, Mittelfranken, Unterfranken, Oberpfalz), weshalb in dieser Arbeit vereinfacht von „Nordbayern“ die Rede ist. Darüber hinaus wurden auch Einsendungen aus Schwaben und vereinzelt aus Oberbayern berücksichtigt (Tabelle 3; Abbildung 4).

**Tabelle 3: Herkunft und Verteilung der untersuchten Schafaborte (n = 200) und Schafbestände (n = 107)**

<b>Regierungs- bezirk</b>	<b>Anzahl eingesandter Aborte</b>	<b>Anzahl untersuchter Herden/Bestände</b>	<b>Landkreise/ kreisfreie Städte</b>
Oberfranken	16	12	Bamberg, Bayreuth, Coburg, Forchheim, Hof, Kronach
Mittelfranken	101	37	Ansbach, Erlangen, Erlangen-Höchstädt, Neustadt an der Aisch-Bad Windsheim, Nürnberg, Nürnberger Land, Roth, Weißenburg-Gunzenhausen
Unterfranken	34	24	Aschaffenburg, Haßberge, Kitzingen, Main-Spessart, Miltenberg, Schweinfurt, Würzburg
Oberpfalz	15	12	Amberg-Weizsach, Neumarkt in der Oberpfalz, Neustadt an der Waldnaab, Schwandorf, Tirschenreuth
Schwaben	27	17	Aichach-Friedberg, Augsburg, Dillingen an der Donau, Donau-Ries, Günzburg, Lindau (Bodensee), Oberallgäu, Ostallgäu, Unterallgäu
Oberbayern	7	5	Dachau, Neuburg-Schrobenhausen



**Abbildung 4: Karte von Bayern.** Gelb: Landkreise und kreisfreie Städte, aus denen das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Abortmaterial stammt; rote Punkte: Herkunft der *T. gondii*-positiven Fälle; grüne Punkte: Herkunft der *N. caninum*-positiven Fälle (Kartengrundlage: Bayerische Vermessungsverwaltung – [www.geodaten.bayern.de](http://www.geodaten.bayern.de), 2020; modifiziert)

In Folgendem sind weitere relevante Ergebnisse zu den untersuchten Abortfällen aufgeführt. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf den zusätzlichen – nicht in der Publikation Meixner et al. (2020) mit aufgenommenen - Befunden bei *T. gondii*- (Tabelle 4) sowie *N. caninum*-assoziierten Abortgeschehen (Tabelle 5).

In 15 der 16 protozoen-assoziierten Schafaborte war eine multifokale nekrotisierende Plazentitis zu beobachten (vgl. Abschnitt III. und Tabelle 5). Über die *T. gondii*- und *N. caninum*-positiven Fälle hinaus, war in über der Hälfte der untersuchten Eihäute eine nekrotisierende bis eitrig-nekrotisierende Plazentitis zu beobachten.

Tabelle 4: Weitere Angaben und Untersuchungsergebnisse zu den *T. gondii*-assoziierten Schafaborten

Fallnummer*	Labornummer	SSL (in cm)	Abortmonat†	Weitere Aborterreger nachgewiesen	PCR-Ergebnisse‡
1	B1-043-15§	40/36 (Z)	5.	–	20,82
2	B1-190-13	38	5.	–	24,37
3	B1-005-11	35/35 (Z)	4.	–	19,68
4	B1-033-11	40	5.	–	24,91
5	B1-042-15§	30	4.	–	19,48
6	B1-013-12	15 (M)	3.	–	25,19
7	B1-036-08	37	4.	<i>Chlamydia</i> spp.	20,59
8	B1-024-06	35	4.	–	21,15
9	B1-073-05	37	4.	–	22,23

M = Fetus mumifiziert; Z = Zwillinge.

\*Die Fallnummern beziehen sich auf die Zuordnung der Abortfälle in der Publikation Meixner et al. (2020) (vgl. Abschnitt III., Table 2 und 3)

† Abortmonat gemäß Scheitel-Steiß-Länge (SSL) (Evans und Sack, 1973)

‡ Ct-Werte für die Amplifikation von *T. gondii*

§ stammen aus dem gleichen Bestand

Tabelle 5: Weitere Angaben und Untersuchungsergebnisse zu den *N. caninum*-assoziierten Schafaborten

Fallnummer*	Labor-nummer	SSL (in cm)	Abortmonat†	Weitere Aborterreger nachgewiesen	Histologische Befunde‡					
					Eihaut	Gehirn	Herz	Lunge	Leber	Muskulatur
10	B1-155-16	33	4.	–	+	+	+	–	–	–
–	B1-049-12§	13 (M)	3.	<i>Chlamydia</i> spp.	+	ND	–	ND	ND	ND
–	B1-064-12§	k. A.	5.	–	–	+	–	–	–	–
–	B1-246-11	27 (M)	4.	<i>Chlamydia</i> spp.	+	+	–	–	–	ND
–	B1-008-07	28/21 (Z)	4.	–	+	ND	ND	–	ND	ND
–	B1-158-04	16	3.	–	+	A	+	–	–	ND
–	B1-081-03	19 (M)	3.	–	+	ND	ND	ND	ND	ND

k. A. = keine Angabe; M = Fetus mumifiziert; Z = Zwillinge.

\* Die Fallnummer bezieht sich auf die Zuordnung der Abortfälle in der Publikation Meixner et al. (2020) (vgl. Abschnitt III., Table 2)

† Abortmonat gemäß Scheitel-Steiß-Länge (SSL) (Evans und Sack, 1973)

‡ + = Gewebe/Organ mit charakteristischen Veränderungen; – = Gewebe/Organ ohne charakteristische Veränderungen; ND = nicht durchgeführt, da Gewebe/Organ nicht vorhanden; A = aufgrund fortgeschrittener Autolyse nicht mehr beurteilbar.

§ stammen aus dem gleichen Bestand

## V. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorkommen von *T. gondii* als Aborterreger bei Schafaborten im Sektionsgut der Veterinärpathologie des LGL in Erlangen zu ermitteln. Hierfür wurden insgesamt 200 Einsendungen, vorwiegend aus dem nordbayerischen Raum, aus den Jahren 2003 bis 2018 retrospektiv untersucht. Dabei kamen verschiedene diagnostische Nachweistechiken zum Einsatz, die zum Teil bereits vor der Durchführung dieser Studie in der Routinediagnostik am LGL Anwendung fanden - Histopathologie und IHC - sowie im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu am Landesamt etablierte Methoden - ISH und real-time PCR - die miteinander verglichen werden sollten. Auf Grundlage dieses Vergleiches sollte eine für die künftige Diagnostik des Erregers geeignete Methode bzw. Methodenkombination gefunden werden. Ferner wurden dieselben 200 Abortfälle auf das Vorkommen von *N. caninum* untersucht, um das Auftreten des Erregers als Differentialdiagnose zu *T. gondii* zu bestimmen.

### 1. Vorkommen von *T. gondii* bei Schafaborten im Einsendungsgut aus Nordbayern

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit in neun von 200 (4,5 %) eingesandten Schafaborten eine Infektion mit *T. gondii* festgestellt werden. *T. gondii* ist damit, nach Chlamydien, der am zweithäufigsten nachgewiesene Aborterreger im untersuchten Einsendungsgut. Aufgrund der Tatsache, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Aborte ausschließlich aus dem zur Diagnostik eingesandten Material der Veterinärpathologie des LGL in Erlangen stammten, können die Fälle jedoch nicht als repräsentativ für ganz Bayern bzw. Nordbayern angesehen werden. Zudem wurde von einigen Betrieben teilweise mehrfach Abortmaterial eingesandt. Bezüglich der untersuchten Schafherden liegt die Prävalenz der *T. gondii*-assoziierten Abortgeschehen bei 7 % (8/107).

Wenngleich weltweit viele Studien zum Vorkommen von *T. gondii* bei Schafaborten existieren, ist ein Vergleich der Ergebnisse aufgrund von Unterschieden in Material und Methodik häufig nur eingeschränkt möglich. In der vorliegenden Studie wurde ein Fall dann als positiv bewertet, wenn *T. gondii*-DNA mittels real-time PCR in der Eihaut nachgewiesen werden konnte. Obwohl die Plazenta in einigen experimentellen

Infektionsstudien als das geeignetste Material für einen molekularbiologischen Nachweis von *T. gondii* angesehen wird (Gutierrez et al., 2010; Owen et al., 1998), steht sie in Feldstudien für einen Nachweis nicht immer zur Verfügung. Demnach wurden häufig in erster Linie das Gehirn oder andere fetale Organe untersucht (Hurtado et al., 2001; Moreno et al., 2012; Pereira-Bueno et al., 2004). Aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung des Erregers in fetalen Geweben variiert die Nachweishäufigkeit jedoch in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe (Duncanson et al., 2001; Hurtado et al., 2001). Ferner sind nach eigenen Beobachtungen und denen von Steuber et al. (1995) positive immunhistologische und mittels PCR erzielte Ergebnisse bei Eihautgewebe vergleichbar.

Bei der Untersuchung von Plazentagewebe mittels IHC wurden in ungarischen Studien Nachweisraten von 1 % (2/246) und 8 % (5/59) erzielt (Szeredi und Bacsadi, 2002; Szeredi et al., 2006); letztere sind mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie vergleichbar. In einer Schweizer Studie wurde hingegen in 19 % (16/86) der untersuchten Fälle *T. gondii*-Antigen immunhistologisch nachgewiesen (Chanton-Greutmann et al., 2002). Bei molekularbiologischen Untersuchungen in Sardinien lagen die Nachweisraten von *T. gondii* in Eihäuten bei 32 % (42/133) (Masala et al., 2003), 13 % (10/76) (Masala et al., 2007) und 4 % (5/142) (Chessa et al., 2014). Über das Vorkommen von *T. gondii* als Abortursache in deutschen Schafherden gibt es bisher kaum aktuelle Daten. Steuber et al. (1995) untersuchten unter anderem Eihäute von Schafaborten aus dem Rheinland, Baden-Württemberg und Hessen mittels PCR und erzielten in 11 % (5/47) der Fälle einen Nachweis und damit etwas häufiger als in der vorliegenden Studie.

Die unterschiedliche Vorkommenshäufigkeit von *T. gondii* bei Schafaborten wird vermutlich durch mehrere Faktoren beeinflusst. Der Hauskatze als Endwirt und Oozysten-Ausscheider dürfte dabei eine wesentliche Bedeutung durch die Kontamination von Ställen, Weiden, Futter und Tränkwasser zukommen (Cenci-Goga et al., 2013; Klun et al., 2006; Skjerve et al., 1998; Tzanidakis et al., 2012; Vesco et al., 2007). Darüber hinaus beeinflussen geographische und klimatische Faktoren die Überlebensdauer der Oozysten auf kontaminierten Weideflächen oder in der Umgebung der Stallungen (Jokelainen et al., 2010; Klun et al., 2006; Skjerve et al., 1998). Daher wirken sich nicht zuletzt unterschiedliche Haltungsformen, Weidestrategien oder das Futtermangement auf das Infektionsrisiko von Schafen

(Cenci-Goga et al., 2013; Klun et al., 2006; Skjerve et al., 1998; Tzanidakis et al., 2012; Vesco et al., 2007), und somit auch von trächtigen Tieren, aus.

Ein Grund für die verhältnismäßig niedrige Nachweisrate in der vorliegenden Arbeit könnte außerdem im sporadischen Auftreten der ovinen Toxoplasmose liegen. Aus diesem Grund könnte nur in einzelnen derartigen Fällen Abortmaterial für eine pathologische Untersuchung eingesandt werden (Dubey, 2009) im Vergleich zu anderen Infektionskrankheiten, in denen es zu seuchenartigen Abortverläufen kommt wie z. B. beim Chlamydienabort.

In acht der neun Abortfälle lagen charakteristische histopathologische Veränderungen in der Plazenta und/oder im Gehirn, teils in Kombination mit vereinzelt reaktionslosen Gewebezysten in Herz, Lunge oder Leber vor (vgl. Abschnitt III., Table 3). Aufgrund der Tatsache, dass kein weiterer Aborterreger festgestellt wurde, gehen wir davon aus, dass *T. gondii* in diesen Fällen die Abortursache darstellt. In einem der neun Fälle (B1-036-08) ist die Bedeutung des Parasiten als Abortursache unklar. Hier lag eine Doppelinfektion mit *T. gondii* und *Chlamydia* spp. vor. Die Eihaut wies eine hochgradige multifokale nekrotisierende Plazentitis auf. In und um die Nekroseherde in den Kotyledonen konnten mittels IHC große Mengen *T. gondii*-Antigen detektiert werden; mikroskopisch waren ferner zahlreiche Chlamydien im Abklatschpräparat nachweisbar, so dass wir von einem Zusammenspiel beider Erreger in diesem Abortfall ausgehen. Auch andere Autoren beschreiben das Zusammenwirken von *T. gondii* und *Chlamydia* spp. als Abortursache in Schafherden (Brodie et al., 1983; Gutierrez et al., 2012; Hazlett et al., 2013; Steuber et al., 1995; Szeredi und Bacsadi, 2002).

## 2. Überlegungen zur Pathomorphologie der *T. gondii*-positiven Fälle

Alle neun *T. gondii*-assoziierten Abortfälle fanden in der Mitte oder gegen Ende der Trächtigkeit statt, sechs im dritten bis vierten, drei im fünften Trächtigkeitsmonat. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Pereira-Bueno et al. (2004), in deren Studie 60 % der *T. gondii*-positiven Feten in der mittleren und 40 % in der späten Trächtigkeit abortiert wurden. Laut Literatur finden *T. gondii*-induzierte Schafaborte am ehesten nach einer Infektion des Muttertieres zwischen dem 60. und 90. Trächtigkeitstag statt. Üblicherweise vergehen jedoch nach einer erfolgten Infektion

des Mutterschafes noch ca. vier weitere Wochen bis zum Auftreten des Abortgeschehens (ca. 90.–120. Tag) (Dubey, 2010c).

Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine retrospektive Untersuchung handelt, wurden die makroskopischen Befunde von Eihäuten und Feten den Aufzeichnungen in den Laborberichten entnommen. Nur in einem von neun Fällen (B1-190-13) wurden makroskopisch kleine, gelblich-weiße, multifokale Nekroseherde in den Kotyledonen der Plazenta beobachtet. Diese Veränderungen gelten als charakteristisch und wurden von anderen Autoren in etwa der Hälfte der untersuchten Fälle beschrieben (Dubey, 2010c; Hartley und Kater, 1963). Die Ausprägung der plazentalen Veränderungen ist jedoch von verschiedenen Faktoren, unter anderem dem Trächtigkeitsstadium, dem Andauern der Infektion oder dem Zeitpunkt des Absterbens der Frucht abhängig (Hartley und Kater, 1963). Zudem müssen nicht alle Kotyledonen im gleichen Maße betroffen sein, weshalb Läsionen leicht übersehen werden können (Dubey, 2010c); insbesondere, wenn die Plazenta nur unvollständig für die pathologisch-anatomische Untersuchung vorliegt. In den betroffenen Feten sind gemäß Dubey (2010c) makroskopisch keine pathognomonischen Veränderungen festzustellen. Dies bestätigen auch die Ergebnisse dieser Studie. In einem Fall (B1-013-12) lag der Fetus mumifiziert vor. Obwohl mumifizierte Feten regelmäßig im Zusammenhang mit *T. gondii*-Aborten beschrieben wurden, sind diese nicht spezifisch für eine Infektion mit *T. gondii*, sondern lediglich Ausdruck eines intrauterinen Fruchttodes mit Austrocknung und Resorption der Fruchtwässer (Buxton, 1998; Hartley und Kater, 1963; Lefebvre, 2015).

### **3. Vergleichende Betrachtung der Nachweismethoden**

#### **3.1. Histopathologie**

Neben der Abklärung anderer mikrobiologischer Ursachen und der pathologisch-anatomischen Untersuchung, ist eine sorgfältige histopathologische Begutachtung ein wesentlicher Bestandteil der Abortdiagnostik (Moeller, 2012). Für den Nachweis *T. gondii*-induzierter Abortgeschehen sind die Plazenta und das fetale Gehirn die bevorzugten Gewebe (Dubey, 2010c; Dubey et al., 1990; Pereira-Bueno et al., 2004). Der Fund charakteristischer Veränderungen steht hierbei im Vordergrund, da Entwicklungsstadien von *T. gondii* nur selten im fetalen Gewebe zu erkennen sind



(Dubey, 2010c; Hartley und Kater, 1963; Uggla et al., 1987). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen konnten auch in der vorliegenden Studie keine Toxoplasmen eindeutig in den H&E-gefärbten Schnitten fetaler Organe oder der Eihäute angesprochen werden. Ein wesentlicher Grund dafür dürfte sein, dass insbesondere in Plazenten *T. gondii* Tachyzoiten auf lichtmikroskopischer Ebene kaum von Trümmern zugrunde gegangener Zellen unterschieden werden können (Dubey, 2010c). Hinzu kommt die zufällige Verteilung meist weniger und reaktionslos im Gewebe liegender, in der Routinefärbung schlecht anfärbbarer Gewebezysten.

Als typische histologische Veränderung der Eihaut wird eine multifokale nekrotisierende Plazentitis, teils mit dystrophischen Verkalkungsherden in den Kotyledonen beschrieben (Dubey, 2010c; Moeller, 2012). In der vorliegenden Arbeit waren derartige Veränderungen in den Kotyledonen aller *T. gondii*-assoziierten Abortgeschehen nachweisbar. Diese morphologischen Veränderungen sind charakteristisch für eine Infektion mit *T. gondii*, jedoch nicht spezifisch. Letzteres bestätigt auch eine frühere Studie aus Spanien, in welcher in sieben von elf untersuchten Eihäuten entsprechende Veränderungen (multifokale Nekrosen mit Verkalkungen) in den Kotyledonen zu beobachten waren, jedoch nur in drei Fällen *T. gondii* mittels PCR nachgewiesen werden konnte (Hurtado et al., 2001). Auch in der vorliegenden Studie wurden ähnliche Veränderungen in weiteren, nicht protozoen-assoziierten Abortfällen beobachtet. In diesen Fällen wurden zum Teil andere Aborterreger, insbesondere *Chlamydia* spp. nachgewiesen. Chlamydien können ebenfalls Nekrosen in der Eihaut hervorrufen (Chanton-Greutmann et al., 2002; Drdlicek, 2009; Moeller, 2012; Szeredi und Bacsadi, 2002); in den untersuchten Schafaborten wurden sie außerdem als häufigste infektiöse Abortursache (84/200) identifiziert.

Das Gehirn ist das fetale Organ, in dem am häufigsten mikroskopische Läsionen auftreten. Charakteristische Veränderungen wie multifokale Nekroseherde und Gliazellproliferationen können laut Literatur in rund 90 % der pränatal mit *T. gondii* infizierten Feten gefunden werden (Buxton, 1998; Buxton und Finlayson, 1986; Buxton et al., 1982; Dubey, 2010c; Hartley und Kater, 1963; Moeller, 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden entsprechende Veränderungen in sechs der acht zur Untersuchung vorliegenden Gehirne *T. gondii*-infizierten Schaffeten festgestellt. In einem der neun Fälle (B1-013-12) konnte das Gehirn aufgrund der Mumifikation des

Fetus nicht mehr histologisch untersucht werden. Ähnliche Gehirnläsionen konnten außerdem in drei Schaffeten, in deren Eihaut *N. caninum*-DNA nachgewiesen wurde, beobachtet werden (vgl. Abschnitt V.4). In den anderen fetalen Organen (Herz, Leber, Lunge, Skelettmuskulatur) konnten keine typischen histopathologischen Veränderungen gefunden werden, wobei zu sagen ist, dass nur in einzelnen Fällen das komplette Organspektrum zur Verfügung stand.

### **3.2. Immunhistochemie**

Die immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten fetaler Organe und der Plazenta gilt, neben der PCR, als eine der bevorzugten Methoden zum Nachweis von *T. gondii* in Schafaborten (Njaa, 2012). Im Gegensatz zur PCR bietet die IHC die Möglichkeit, den Erreger direkt in Verbindung mit den histologischen Veränderungen (Nekrosen, Entzündungsherde) anzusprechen (Andres et al., 1981; Uggla et al., 1987). Mit Kenntnis von Lokalisation und Verteilung im Gewebe kann die ursächliche Beteiligung des Erregers am Abortgeschehen leichter beurteilt werden.

Uggla et al. (1987) beschreiben die IHC (PAP-Methode) als eine sensitive und spezifische Methode zur Diagnostik von *T. gondii*-induzierten Abortgeschehen beim Schaf. Im Rahmen ihrer Studie untersuchten sie sechs experimentell infizierte Schaffeten und Eihäute. Hierbei konnte *T. gondii* am häufigsten in den plazentalen Kotyledonen sowie in Herz, Lunge, Gehirn und Skelettmuskulatur des Fetus nachgewiesen werden. Auch Steuber et al. (1995) fanden einzelne Tachyzoiten sowie Tachyzoiten-Cluster vor allem in der Plazenta, aber auch in Leber-, Herz-, Lungen- und Milzproben natürlicher Abortgeschehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen diese Beobachtungen nur teilweise. Übereinstimmend mit der Beschreibung anderer Autoren (Szeredi et al., 2006; Uggla et al., 1987) war *T. gondii*-Antigen in allen neun positiv bewerteten Abortfällen meist in großen Mengen überwiegend im Bereich der Nekroseherde in den Kotyledonen vorhanden. Im Gegensatz dazu konnten in den fetalen Organen nur vereinzelte, reaktionslose Gewebezysten nachgewiesen werden, in zwei Fällen im Herz (B1-005-11 und B1-024-06) und in einem Fall in der Lunge (B1-042-15). Trotz des teilweisen Vorliegens charakteristischer histologischer Veränderungen waren in keinem der Gehirne *T. gondii*-positiver Feten immunhistologisch Toxoplasmen nachweisbar.

Das vermehrte Vorkommen von Toxoplasmen in der Eihaut im Vergleich zu den fetalen Organen hängt vermutlich damit zusammen, dass der Erreger vor der Ausbreitung in die fetalen Organe zunächst die Plazentome besiedelt (Buxton und Finlayson, 1986; Hartley und Kater, 1963). Mittels quantitativer real-time PCR konnten Gutierrez et al. (2010) zudem nachweisen, dass in der Plazenta zum frühesten Zeitpunkt nach einer Infektion Erreger nachweisbar sind und dort zudem die höchsten Erregerkonzentrationen vorliegt.

Einen weiteren Grund für die niedrigere Nachweisrate in fetalen Organen, dürfte die ungleichmäßige Verteilung des Erregers im Gewebe darstellen (Hurtado et al., 2001). In einer früheren, ebenfalls am LGL in Erlangen durchgeführten Dissertation zum Nachweis von *N. caninum* in Rinderfeten waren in einzelnen Fällen bis zu vier immunhistochemische Untersuchungsläufe nötig, um den Erreger in histologisch veränderten Gewebeschnitten nachzuweisen (Sörgel, 2008). In der vorliegenden Studie wurden die vorhandenen fetalen Organe und Plazenten nur jeweils einmal immunhistologisch untersucht, vor allem auch deswegen, weil nur begrenzt Material zur Verfügung stand und dieses noch für weitere Untersuchungen (ISH, PCR) im Rahmen dieser Arbeit genutzt werden sollte.

Bis heute gibt es nur wenige veröffentlichte Studien, in denen die IHC mit der PCR zum Nachweis von *T. gondii* in Schafaborten verglichen wurde. Im Rahmen einer in Deutschland durchgeführten Studie, gelang es Steuber et al. (1995) alle PCR-positiven Ergebnisse mittels IHC (PAP-Methode) zu bestätigen. Jedoch schlug der PCR-Nachweis aus den fetalen Organen eines positiven Falles fehl, in dem der Erreger mittels IHC nachweisbar war. Beim Nachweis in Plazentagewebe erwiesen sich die beiden Methoden in dieser Studie als gleich sensitiv (Steuber et al., 1995).

Auch in der vorliegenden Arbeit waren die Untersuchungsergebnisse der IHC und der PCR, die Eihaut betreffend, vergleichbar. Die für die IHC ermittelte Sensitivität lag dabei bei 100 % (95 % CI: 66–100 %); ihre Spezifität bei 96–100 % (95 % CIs: 93–99 % und 98–100 %). Die geringere Spezifität der Methode resultiert aus den sieben nicht eindeutig beurteilbaren und somit als fraglich bewerteten Fällen. Unspezifische Anfärbungen, insbesondere granulärer Strukturen die zum Teil nicht zweifelsfrei von intakten oder zugrunde gegangen protozoären Mikroorganismen abgegrenzt werden konnten, erschwerten dabei die Beurteilung der immunhistologischen Präparate. Da

sowohl die PCR als auch die ISH in diesen Fällen negative Ergebnisse erzielten, wurden diese auch insgesamt als negativ bewertet.

Unspezifische Hintergrundfärbungen stellen ein Hauptproblem für die Interpretation der IHC dar (Ramos-Vara, 2005). Hierbei spielen eine Vielzahl von Einflussfaktoren, u. a. die Interaktion des Primärantikörpers, endogene Enzymaktivitäten oder die Beschaffenheit des Gewebes eine wichtige Rolle (Bussolati und Leonardo, 2008; Cartun et al., 2018; Fritschy, 2008; Ramos-Vara, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein aus dem Serum immunisierter Kaninchen gewonnener kommerziell erhältlicher, polyklonaler Antikörper (pAK) für den immunhistochemischen Nachweis von *T. gondii* verwendet. Polyklonale Antikörper haben gegenüber monoklonalen Antikörpern grundsätzlich eine höhere Sensitivität, dafür jedoch eine geringere Spezifität (Hayat, 2002; Ramos-Vara, 2005). Der in dieser Studie verwendete pAK wurde bereits in anderen Studien erfolgreich auf Schafplazenta eingesetzt (Hazlett et al., 2013; Szeredi und Bacsadi, 2002; Szeredi et al., 2006). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden in keiner der drei Studien unspezifische Anfärbungen der Plazenta beschrieben.

Im Gegensatz zur Verwendung Peroxidase-konjugierter Nachweissysteme, zeigen sich alkalische Phosphatase-gekoppelte Systeme weniger anfällig für unspezifische, durch endogene Enzyme bedingte Hintergrundfärbungen. Endogene alkalische Phosphatase wird in der Regel während der Herstellung fixierter Gewebeproben zerstört (Elias, 2003; Ramos-Vara, 2005). Zudem kann die Aktivität der nicht-intestinalen Form des Enzyms durch entsprechende Substanzen, wie Levamisol, geblockt werden (Ponder und Wilkinson, 1981). Im vorliegenden Fall wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Polymersystem zusammen mit einem entsprechenden Blockungsreagenz verwendet. Wenngleich das Vorkommen alkalischer Phosphatasen in der Plazenta von Schafen beschrieben ist (Christie, 1967), ist die endogene Enzymaktivität als Verursacher unspezifischer Reaktionen im vorliegenden Fall demnach eher unwahrscheinlich.

Neben technischen Aspekten, scheint ebenso die Art des Gewebes eine entscheidende Rolle zu spielen. Unspezifische Anfärbungen in der Plazenta von Wiederkäuern wurden bereits von anderen Autoren im Rahmen immunhistochemischer Untersuchungen beschrieben (Schaf: Dilbeck und McElwain, 1994; Rind: Drdlicek,

2009). Dilbeck und McElwain (1994) beobachteten in erster Linie die Färbung von Pflanzentrümmern und Zellpigmenten (Lipofuszin), aber gelegentlich auch diffuse Hintergrundfärbung beim Nachweis von *Coxiella burnetii* mit *Coxiella*-Antiserum. Außerdem können Nekrosen und autolytisches Gewebes eine Ursache für unspezifische Hintergrundfärbung darstellen (Cartun et al., 2018; Meyerholz und Beck, 2018). Auch in der vorliegenden Studie war aus den angeführten Gründen die Interpretation immunhistologischer Färbungen der Eihaut, insbesondere im Bereich von Nekrosen und in autolytischem Material, deutlich erschwert.

Immunologische Kreuzreaktionen mit dem antigenetisch eng verwandten Erreger *N. caninum* können vor allem bei Verwendung polyklonaler, gelegentlich auch bei monoklonalen Antikörpern gegen *T. gondii* vorkommen (McAllister et al., 1996b; Sundermann et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit war jedoch in keinem der *N. caninum*-positiv getesteten Eihäute eine spezifische Anfärbung mittels Toxoplasmen-Antiserum zu erkennen, so dass der eingesetzte Antikörper geeignet scheint, *T. gondii* von *N. caninum* zu unterscheiden.

### 3.3. In-situ-Hybridisierung

Die ISH wurde bereits von verschiedenen Autoren als eine nützliche Methode zum Nachweis unterschiedlicher veterinärmedizinisch relevanter Protozoen in FFPE Gewebeschnitten beschrieben (Chvala et al., 2006; Dinhopl et al., 2011a; Dinhopl et al., 2011b; Menezes et al., 2013; Richter et al., 2008; Susta et al., 2009; Weissenböck et al., 2011). Ebenso wie die IHC, ermöglicht die ISH die direkte Identifizierung des Erregers in Verbindung mit pathologischen Gewebeveränderungen (Mostegl et al., 2011). Obwohl bereits einzelne Veröffentlichungen zum ISH-Nachweis von *T. gondii* existieren (Liu et al., 1998; Ma et al., 2008; Montone, 1994; Schoondermark-Van De Ven et al., 1993), wurde die Methode in der vorliegenden Arbeit – nach bestem Wissen – erstmals zur Detektion des Erregers in ovinem Abortmaterial eingesetzt und evaluiert. Wie für die immunhistologische Untersuchung wurde auch für die ISH Plazentagewebe eingesetzt. Im Gegensatz zur IHC erbrachte die ISH jedoch nur in vier der neun *T. gondii*-positiven Eihäute ein positives Ergebnis. Daraus resultiert eine vergleichsweise niedrige diagnostische Sensitivität der ISH von 44 % (95 % CI: 14–79 %).

Auch Hayden et al. (2001) und Montone et al. (2011) beschrieben eine verminderte Sensitivität der ISH beim Nachweis verschiedener Pilzspezies in FFPE Gewebeschnitten. Insbesondere ausgedehnte Gewebenekrosen scheinen das ISH-Signal deutlich, zum Teil vollständig zu reduzieren (Hayden et al., 2001; Montone et al., 2011; Park et al., 1997). Da alle *T. gondii*-positiv getesteten Eihäuten eine nekrotisierende Plazentitis aufwiesen, könnte dies auch die Erklärung für die falsch-negativen ISH-Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sein. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass in den beiden Eihäuten, in denen nur kleinherdige Nekrosen in den Kotyledonen vorlagen (B1-043-15; B1-190-13), ein positives ISH-Ergebnis erzielt werden konnte. Zum einen ist es möglich, dass nekrotisches Gewebe die Hybridisierung der Nucleinsäuren hemmt (Hayden et al., 2001). Zum anderen kommt es durch die Zerstörung von Gewebe zur Freisetzung endogener Nukleasen und dadurch zum Abbau von Nukleinsäuren, so dass eine Hybridisierung der Oligonucleotidsonde mit der entsprechenden rRNA-Zielsequenz im Gewebe nicht mehr möglich ist (Hayden et al., 2001). In diesem Zusammenhang ist die in dieser Studie für die ISH als Zielsequenz verwendete einzelsträngige rRNA gegenüber Abbauprozessen empfindlicher als die für den PCR-Nachweis verwendete doppelsträngige DNA. Auch antigene Rückstände des Einzellers können weiterhin im Gewebe immunhistochemisch nachweisbar bleiben. Eine weitere Erklärung für die falsch-negativen ISH-Ergebnisse könnte darin bestehen, dass der rRNA-Gehalt einer Zelle nach deren Tod deutlich abnimmt. Aus diesem Grund können nur lebende und somit intakte Erreger mit einer auf dem Nachweis von rRNA-basierenden ISH-Methode im Gewebeschnitt detektiert werden (Montone, 1994; Xie et al., 1989).

Dies würde auch erklären, warum in der vorliegenden Arbeit vermeidlich intakte Gewebestadien (Tachyzoiten und Gewebezysten) mit der ISH überwiegend in den histologisch unveränderten Bereichen der Kotyledonen (v. a. im gut erhaltenem Trophoblastepithel) und vereinzelt auch in fetalen Organen – im Lebergewebe von einem (B1-073-05) und im Herzgewebe von zwei Feten (B1-005-11; B1-033-11) - nachgewiesen werden konnten. Generell weist Abortmaterial häufig einen höheren Grad an Auto- und Heterolyse auf, weshalb diese Faktoren die Nachweisrate der ISH durchaus negativ beeinflusst haben könnten.

Weitere mögliche Faktoren mit negativem Einfluss auf die Sensitivität der ISH, wie eine zu lange Fixierung in Formalin oder die Entkalkung von Gewebeproben mit

salzsäurebasierten Lösungen (Arber et al., 1997; Cassidy und Jones, 2014), sind in der vorliegenden Studie auszuschließen.

Wie Hayden et al. (2001) halten wir einen Nukleotid-Polymorphismus zwischen verschiedenen Stämmen, der zu einer reduzierten Homologie des gesuchten RNA-Abschnittes mit der eingesetzten ISH-Sonde führt, oder eine zu geringe Anzahl von Organismen in den untersuchten Gewebeschnitten ebenfalls bei *T. gondii* für sehr unwahrscheinlich. Zum einen weisen die ausgewählten Sonden-Sequenzen eine vollständige Homologie zu allen zum Zeitpunkt der Sonden-Entwicklung in der „GenBank“-Datenbanken verfügbaren Gensequenzen der 18S bzw. 28S rRNA auf. Zudem wurden beide Sonden in Kombination auf den untersuchten Schnitten angewandt. Zum anderen konnten in der vorliegenden Arbeit selbst einzelne Gewebestadien gut mit der ISH im Gewebe dargestellt werden. Außerdem wiesen die in der ISH falsch-negativen Fälle in der IHC zum Teil eine große Erregerzahl auf.

Ein wesentlicher Vorteil der ISH ist die für gewöhnlich sehr hohe Spezifität dieser Methode, die in anderen Studien zum Nachweis verschiedener Pilzspezies, Viren oder anderen Protozoen als *T. gondii* bei 100 % lag (Hayden et al., 2003; Hayden et al., 2001; Menezes et al., 2013; Pennick et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit lag die Spezifität der ISH etwas darunter, bei 99 % (95 % CI: 97–100 %). Im Gegensatz zur IHC waren in den ISH-gefärbten Gewebeschnitten zwar kaum unspezifische Anfärbungen zu sehen, allerdings erzielte die ISH in einer von sieben *N. caninum*-positiven Eihäuten (B1-155-16) ein falsch-positives Ergebnis. Diese Beobachtung deutet auf eine Kreuzreaktion mindestens einer der beiden eingesetzten ISH-Sonden, die beide Abschnitte der *T. gondii*-rRNA detektieren, hin.

Die rRNA-(Gen-)Sequenzen von *T. gondii* und einigen nahe verwandten zystenbildenden Kokzidien, wie *Hammondia* spp. oder *N. caninum*, weisen zum Teil eine sehr hohe Übereinstimmung auf (Ellis et al., 1994; Ellis et al., 1998; Holmdahl et al., 1994; Jenkins et al., 1999; Mugridge et al., 1999). Trotz dieser Tatsache und der daraus möglicherweise resultierenden Kreuzreaktivität der beiden Sonden, wurden für die vorliegende Studie diese Abschnitte gewählt, da rRNA das einzige Molekül zu sein scheint, welches in ausreichender Menge in der Zelle vorhanden ist, um eine effektive ISH-Markierung von Protozoen zu ermöglichen (Dinhopl et al., 2011a).

Eine potentielle Kreuzreaktivität ist dabei insbesondere für die Sonde zum Nachweis der 18S rRNA denkbar, da diese Gensequenz eine besonders hohe Homologie zwischen *T. gondii* und *N. caninum* aufweist (Ellis et al., 1994; Holmdahl et al., 1994; Jenkins et al., 1999). Beim Entwerfen der Sonde war es deshalb nur möglich, diese mit maximal einem unterschiedlichen Basenpaar (Mismatch) zu konzipieren. Zusätzlich zu dieser Sonde wurde daher eine zweite Sonde - komplementär zur 28S rRNA-Gensequenz, mit insgesamt drei Mismatches - für eine mögliche Differenzierung der beiden Erreger entworfen. Im Rahmen der *in situ* Validierung der Sonden, stellte sich jedoch heraus, dass nur eine Kombination beider Sonden ein ausreichend starkes ISH-Signal für einen deutlichen Nachweis liefert. Dennoch konnte bei der Spezifitätsprüfung beider Sonden auf *N. caninum*-positivem kaninem Gehirngewebe keine Kreuzhybridisierung beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass in den erregerhaltigen Gehirnschnitten überwiegend Gewebezysten zu erkennen waren, in welchen nur eine vergleichsweise langsame Replikation stattfindet. Susta et al. (2009) nahmen für eine andere Protozoenart (*Cytauxzoon felis*) an, dass in langsam replizierenden Entwicklungsstadien ebenfalls nur eine reduzierte Proteinsynthese stattfindet. Aufgrund des daraus resultierenden reduzierten rRNA-Gehalts des Einzellers, kann es daher zu einem verminderten oder sogar abwesenden ISH-Signal kommen.

Auffallend war außerdem, dass nur in einer von sieben *N. caninum*-positiv getestete Eihäuten ein falsch-positives ISH-Signal zu beobachten war. In den anderen sechs Eihäuten war keine Anfärbung tachyzoiten-ähnlicher Strukturen zu erkennen. Gründe hierfür könnten – wie bereits für *T. gondii* erläutert - die histologischen Veränderungen der Eihaut (sechs von sieben Eihäuten wiesen eine multifokale nekrotisierende Plazentitis auf) und der zum Teil schlechte Erhaltungszustand des untersuchten Gewebes darstellen. Hierfür spricht, dass die falsch-positiv detektierte Eihaut relativ gut erhalten war und nur kleinherdige Nekrosen aufwies. Auch Nucleotid-Polymorphismus zwischen einzelnen *N. caninum*-Stämmen ist als Ursache nicht ganz auszuschließen.

Obwohl noch weitere Untersuchungen zur Spezifität der verwendeten ISH-Sonden ausstehen, lassen die vorliegenden Ergebnissen bereits vermuten, dass die etablierte ISH-Methode für eine Differenzierung zwischen *T. gondii* und *N. caninum* eher ungeeignet ist.



### 3.4. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR gilt, neben der IHC, als eine der bevorzugten Methoden zum Nachweis von *T. gondii* in Schafaborten (Borel et al., 2014; Njaa, 2012). Gutierrez et al. (2010) konnten zeigen, dass sich insbesondere die real-time PCR aufgrund ihrer hohen Sensitivität zur Identifikation des Erregers in experimentell infizierten Feten und Eihäuten eignet. Gemäß dieser Studie gilt die Plazenta als Gewebe der Wahl für den Nachweis von *T. gondii* (Gutierrez et al., 2010). Die gute Eignung von plazentalem Gewebe (mit Kotyledonen) für den Nachweis des Einzellers bestätigen auch frühere Studien, in denen sowohl experimentell infizierte als auch natürlich abortierte Feten mit konventionellen PCR-Methoden untersucht wurden (Duncanson et al., 2001; Masala et al., 2003; Owen et al., 1998; Steuber et al., 1995). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit Eihaut als Untersuchungsmaterial für den PCR-Nachweis gewählt. Die real-time PCR diente gleichzeitig als Referenzmethode zur diagnostischen Bewertung der anderen, im Rahmen der Studie etablierten und durchgeführten Methoden. Die Spezifität des verwendeten kommerziellen PCR-Kits bezüglich der Unterscheidung von *T. gondii* und *N. caninum* wurde durch die zusätzliche Durchführung einer real-time PCR zum Nachweis von *N. caninum* überprüft. Keine der *N. caninum*-positiv getesteten Eihäute erbrachte im Rahmen der *T. gondii*-PCR ein positives Ergebnis. Dies spricht, neben einer hohen Sensitivität, ebenso für eine hohe Spezifität der durchgeführten Methode und damit für die Eignung zur Differenzierung beider nahe verwandter Erreger.

Neben der hohen Sensitivität und Spezifität bietet die PCR vor allem gegenüber einer histopathologischen Untersuchung den Vorteil, dass auch autolytische Gewebeproben auf das Vorhandensein von *T. gondii*-DNA untersucht werden können (Hurtado et al., 2001). Da jedoch vor allem schlecht erhaltenes und stark verändertes Untersuchungsmaterial vermehrt Inhibitoren - Substanzen, die einen negativen Effekt auf die PCR-Amplifikation haben - enthalten kann (Navarro et al., 2009; Hinić et al., 2009), spielt die Extraktion des Gewebes hier eine entscheidende Rolle. Gleiches gilt für die Verwendung von FFPE Gewebeproben (Okello et al., 2010). Um die Zuverlässigkeit der Extraktion besser beurteilen zu können, wurde eine interne Kontrolle (IC) im PCR-Lauf mitgeführt (Duplex-PCR). Als endogene IC diente dabei ein sogenanntes „Housekeeping“-Gen, welches relativ konstant im untersuchten Gewebe exprimiert wird. Unter Zuhilfenahme einer unabhängig vom Ziel-Gen amplifizierten IC ist es

möglich, falsch-negative Ergebnisse, die durch eine Inhibition der PCR-Amplifikation oder Nukleinsäure-Verluste bei der DNA-Extraktion entstehen können, auszuschließen (Hoffmann et al., 2006). Eine erfolgreich amplifizierte IC liefert somit eine Aussage über eine gelungene Zelllyse, Extraktion und Amplifikation der Probe. Durch die Verwendung eines „Housekeeping“-Genes kann außerdem ein Rückschluss auf die Qualität der untersuchten Probe gezogen werden. Dies ermöglicht ebenfalls die Bewertung schlecht erhaltener Gewebeproben. In dieser Studie konnte in allen FFPE Gewebeproben die IC erfolgreich nachgewiesen werden.

Die hohe Sensitivität der PCR birgt jedoch auch Nachteile. Zum einen ist die Methode sehr kontaminationsanfällig, wodurch es leicht zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann (Aslanzadeh, 2004; Borst et al., 2004). Da die Amplifikation bei der real-time PCR in einem geschlossenen System stattfindet, ist das Risiko einer Kontamination durch Amplifikationsprodukte bei deren Durchführung zwar erheblich geringer als bei der konventionellen PCR, Verschleppungen zwischen einzelnen Proben können jedoch auf allen Ebenen der Gewinnung und Aufbereitung stattfinden (Espy et al., 2006).

Zum anderen werden mittels PCR nur Genomabschnitte des Erregers nachgewiesen, so dass allein aufgrund eines positiven PCR-Ergebnisses keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob der Erreger auch die Ursache des Abortgeschehens darstellt (Hazlett et al., 2013), oder dieser eventuell festgestellte morphologische Veränderungen hervorgerufen hat. Sowohl Duncanson et al. (2001) als auch Williams et al. (2005) konnten in 42 % bzw. 46 % der Eihäute augenscheinlich gesunder, lebend geborener Lämmer *T. gondii*-DNA mittel PCR nachweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine kongenitale diaplazentale Übertragung des Erregers auf den Fetus nicht zwangsläufig zum Absterben bzw. Abort desselben führen muss. Insbesondere, wenn neben *T. gondii* ein weiterer Aborterreger nachgewiesen wurde, wie es auch in der vorliegenden Studie einmal der Fall war (vgl. Abschnitt V.1), ist eine abschließende kausale Beurteilung nicht möglich. Aus diesem Grund sollten positive PCR-Resultate stets unter Einbeziehung des Vorberichtes, makroskopischer und histologischer Befunde sowie weiterer Methoden zum Nachweis bzw. Ausschluss anderer relevanter Aborterreger, mittels Bakterienkultur, mikroskopischer Untersuchung (Abklatschpräparat mit Stamp-Färbung), PCR oder IHC, bewertet werden.

#### 4. Nachweis von *N. caninum* bei den eingesandten Schafaborten

*N. caninum* verursacht, wie mehrfach im Rahmen experimenteller Infektionsversuche beschrieben (Buxton et al., 1997; Buxton et al., 1998; Dubey und Lindsay, 1990; McAllister et al., 1996a), sehr ähnliche pathologisch-anatomische und histopathologische Veränderungen in Schaffeten und Eihäuten wie *T. gondii*. In der vorliegenden Arbeit sollte *T. gondii* daher von diesem nahe verwandten Erreger abgegrenzt und ermittelt werden, wie häufig *N. caninum* im Vergleich zu *T. gondii* bei Schafaborten im Einsendungsgut des LGL in Erlangen nachzuweisen ist.

Für die Differenzierung der beiden Protozoen halten Moreno et al. (2012) die PCR für geeignet. Auch in einem zuvor am LGL in Erlangen durchgeführten Methodenvergleich an Rinderfeten wurde die PCR (ergänzend zur histopathologischen Untersuchung) als geeignetste Diagnostikmethode zum Nachweis von *N. caninum* ermittelt (Sörgel, 2008). Aus diesem Grund wurde der Nachweis von *N. caninum* in der vorliegenden Arbeit an FFPE Eihäuten mittels PCR geführt. Wenngleich häufig fetales Gehirngewebe für den DNA-Nachweis verwendet wird (Hässig et al., 2003; Moreno et al., 2012; Razmi und Naseri, 2017), halten einige Autoren auch Plazentagewebe für geeignet (Asadpour et al., 2013; Howe et al., 2008).

Insgesamt konnte in sieben von 200 (3,5 %) Abortfällen aus sechs Beständen, eine Infektion mit *N. caninum* ermittelt werden. *N. caninum* ist damit, nach Chlamydien, *T. gondii* und Coxiellen, der am vierthäufigsten nachgewiesene Aborterreger bei den untersuchten Schafaborten. Ähnlich häufig wie in der vorliegenden Arbeit, wurde *N. caninum* auch bei abortierten Schaffeten in einer Studie aus Spanien (5/74; 6,8 %; Moreno et al., 2012), einer Studie aus Italien (6/292; 2 %; Masala et al., 2007) und zwei iranischen Studien (7/71; 10 %; Razmi und Naseri, 2017; 6/70; 8,5 %; Asadpour et al., 2013) mittels PCR detektiert.

Wie bereits für *T. gondii* beschrieben, muss ein positives PCR-Ergebnis auch in diesen Fällen in Verbindung mit den gefundenen Veränderungen sowie den Ergebnissen weiterer Untersuchungsmethoden zur Abklärung anderer Aborterreger betrachtet werden.

Makroskopisch wies eine der *N. caninum*-positiven Eihäute (B1-155-16) charakteristische Veränderungen (kleine, gelblich-weiße, multifokale Nekroseherde in den Kotyledonen) auf, die auf eine Infektion mit beiden Protozoen hindeuten

können (Buxton, 1998; Buxton et al., 1998). Mikroskopisch konnte in den Kotyledonen von sechs der sieben *N. caninum*-assoziierten Abortgeschehen eine entsprechende multifokale nekrotisierende Plazentitis beobachtet werden (vgl. Abschnitt V.3.1.). Die Beurteilung histologischer Veränderungen in den zugehörigen fetalen Organen war in einigen Fällen, aufgrund der zum Teil mumifiziert vorliegenden Feten oder fehlender Organe nur eingeschränkt möglich. Insgesamt lag nur in vier der sieben Fälle Gehirngewebe für eine weitere mikroskopische Beurteilung vor, wobei in einem Fall (B1-158-04) das Gehirn aufgrund fortgeschrittener Autolyse nicht mehr beurteilbar war. In den übrigen drei Fällen lagen multifokale Nekrose- und Gliazellherde als Hinweis auf eine protozoäre Enzephalitis vor. Im Gegensatz zu den mit *T. gondii* infizierten Feten war außerdem bei zwei von fünf *N. caninum*-assoziierten Abortfällen, bei denen Herz zur Untersuchung vorlag, eine multifokale gemischtzellige Myokarditis zu beobachten (vgl. Abschnitt IV., Tabelle 5).

Diese Ergebnisse differieren etwas mit den Beobachtungen von Moreno et al. (2012). Während wir ebenfalls eine protozoäre Enzephalitis im Zusammenhang mit beiden Erregern nachweisen konnten, lagen entsprechende Veränderungen im Myokard nur bei Infektion mit *N. caninum* vor. Demgegenüber fanden Moreno et al. (2012) Myokarditiden sogar häufiger in *T. gondii*-infizierten Schaffeten. Läsionen in Leber und Lunge, wie sie vereinzelt bei *N. caninum*-infizierten Schaffeten nachgewiesen wurden (Buxton et al., 1997; McAllister et al., 1996a; Moreno et al., 2012), konnten wir nicht beobachten.

Im Rahmen der Routinediagnostik wurde in zwei der sieben *N. caninum*-positiven Fälle (B1-049-12, B1-246-11) eine zusätzliche Infektion mit *Chlamydia* spp. mikroskopisch und mittels Antigen-Test nachgewiesen. In einem Fall lagen charakteristische Veränderungen im Gehirn vor, so dass wir zumindest in diesem Fall von einer kausalen Beteiligung des Parasiten am Abortgeschehen ausgehen. In den übrigen fünf Fällen wurde kein weiterer Aborterreger nachgewiesen, so dass wie auch in diesen Fällen ein *N. caninum*-induziertes Abortgeschehen vermuten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Beobachtungen anderer Studien, gemäß derer eine Unterscheidung der beiden Erreger alleine anhand des pathomorphologischen Erscheinungsbildes nicht möglich ist (McAllister et al., 1996a; Moreno et al., 2012). Es bedarf daher spezifischer Methoden zum Nachweis und der

Differenzierung der beiden Erreger. Die Ergebnisse weisen außerdem darauf hin, dass *N. caninum* in Nordbayern als Aborterreger vergleichbar häufig wie *T. gondii* bei Schafen vorkommen könnte. Daher sollte stets ein differenzialdiagnostischer Ausschluss bei Vorliegen verdächtiger Läsionen geführt werden.

Auch aus epidemiologischen und prophylaktischen Gesichtspunkten ist eine Differenzierung beider Erreger von Bedeutung. Während die sexuelle Vermehrung von *T. gondii* ausschließlich in Feliden stattfindet, stellen Kaniden für *N. caninum* die Endwirte dar (Dubey et al., 2007; Tenter et al., 2000). Es wird vermutet, dass die Verfütterung erregerhaltiger (Rinder-)Plazenta ein wesentliches Infektionsrisiko für Hofhunde darstellt, weshalb Abortmaterial – auch aus allgemein hygienischer Sicht – sicher entsorgt werden sollte (Dijkstra et al., 2002; Dijkstra et al., 2001; Dubey et al., 2007). Zur Vorbeugung der ovinen Toxoplasmose steht außerdem ein kommerziell erhältlicher attenuierter Lebendimpfstoff zur Verfügung, der aktuell jedoch nicht in Deutschland zugelassen ist (Buxton und Innes, 1995; Innes et al., 2019). Des Weiteren gilt *N. caninum* im Gegensatz zu *T. gondii* nicht als Zoonoseerreger (Dubey et al., 2007; Tenter et al., 2000).

## **5. Empfehlungen für den Nachweis von *T. gondii* als Aborterreger beim Schaf in der Routinediagnostik**

Die histopathologische Untersuchung ist als Bestandteil der Routinediagnostik bei Schafaborten unerlässlich. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Fund charakteristischer mikroskopischer Veränderungen im fetalen Gehirn einen guten Hinweis auf ein protozoen-induziertes Abortgeschehen liefern kann. Hierfür sollten im Rahmen der Sektion mehrere Bereiche des fetalen Gehirns für die histologische Untersuchung entnommen werden. Basierend auf ihren Untersuchungen empfehlen O'Donovan et al. (2012) für den Nachweis *T. gondii*-induzierter Läsionen vor allem Gewebeproben auf der Transversalebene des optischen Trakts, dem vorderen Rand der Brücke oder ca. 4 mm kaudal des *Sulcus cruciatus*. Auch eine multifokale nekrotisierende Plazentitis kann ein Indiz für eine ursächliche Beteiligung von Protozoen am Abortgeschehen darstellen, allerdings sind entsprechende Veränderungen der Eihaut deutlich weniger spezifisch als die ZNS-Veränderungen. Auffällige histopathologische Befunde sollten stets mit mindestens einer weiteren

spezifischen Diagnostikmethode im Hinblick auf das Vorkommen von *T. gondii* und dessen Abgrenzung zu *N. caninum* weiter ätiologisch abgeklärt werden.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist hierfür die real-time PCR zu empfehlen. Als Routineuntersuchungsmethode bietet sie den Vorteil eines sensitiven, spezifischen und schnellen Erregernachweises. Durch die Verwendung eines kommerziellen PCR-Test-Kits, ist die Methode außerdem verhältnismäßig einfach und schnell in jedem PCR-Labor zu etablieren. Seit Juni 2019 ist außerdem ein vom FLI zugelassenes, kommerziell verfügbares real-time PCR-Test-Kit für den Nachweis von *T. gondii* aus Gewebeproben von Wiederkäuern erhältlich (FLI, 2020).

IHC und ISH bieten den Vorteil, den Erreger im Bezug zu den histologischen Veränderungen darzustellen, was insbesondere für die histopathologische Beurteilung und Bewertung des Erregers als Abortursache von Bedeutung ist.

Wird ein morphologischer Nachweis von *T. gondii* angestrebt, ist hierfür die IHC zu empfehlen. Sie eignet sich wegen ihrer hohen Sensitivität grundsätzlich gut für ein Screening von Eihäuten von Schafen auf das Vorkommen des Erregers. Insbesondere bei schlecht erhaltenen Gewebeproben kann die mikroskopische Begutachtung der immunhistologischen Präparate jedoch sehr zeitaufwendig sein; außerdem setzt sie entsprechende Erfahrung in der Interpretation falsch-positiver Färbeergebnisse voraus. Gegebenenfalls müssen fragliche Fälle zusätzlich mittels PCR abgeklärt werden. Andere fetale Organe können hingegen nur eingeschränkt für den IHC-Nachweis empfohlen werden, da nur selten mit einem Erregernachweis zu rechnen ist.

Die ISH eignet sich im Gegensatz zu den anderen beiden Methoden, ausschließlich als ergänzende Methode zur Visualisierung von *T. gondii* in gut erhaltenen, größtenteils unveränderten Gewebeproben. Dies schränkt deren Verwendung zum Nachweis von *T. gondii* in Abortmaterial erheblich ein. Aufgrund des Fehlens unspezifischer Hintergrundfärbung ist die Beurteilung ISH-gefärbter Gewebeschnitte, im Gegensatz zur IHC, jedoch deutlich einfacher möglich.

## 6. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die In-situ-Hybridisierung grundsätzlich eine wertvolle Ergänzung für die histologische Aufarbeitung von Fällen im Rahmen der pathologischen Untersuchung darstellen kann. Im Gegensatz zum Nachweis von *T. gondii*, einem Erreger, der ebenfalls in der Humanmedizin eine wichtige Rolle spielt, stehen für andere überwiegend veterinärmedizinisch relevante Erreger häufig keine kommerziell erhältlichen Antikörper für den immunhistologischen Nachweis zur Verfügung. Hier liegt ein Vorteil der ISH. Maßgeschneiderte Oligonucleotide, und somit auch Sonden für die ISH, können verhältnismäßig schnell und kostengünstig synthetisiert werden (Jin und Lloyd, 1997). Diesen Service bieten heutzutage viele Biotechnologieunternehmen (bspw. Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) kommerziell an. Für die Herstellung bedarf es lediglich einer geeigneten Nukleotidsequenz. Entsprechende Sequenzen wurden in der Vergangenheit bereits für verschiedene veterinärmedizinisch relevante Erreger evaluiert und veröffentlicht, im deutschsprachigen Raum vor allem von einer Arbeitsgruppe der Veterinärmedizinischen Universität Wien um Univ.-Prof. Dr. Herbert Weissenböck (Binanti et al., 2014; Chvala et al., 2006; Chvala et al., 2004; Dinhopl et al., 2011a; Dinhopl et al., 2011b; Weissenböck et al., 2007; Weissenböck et al., 2011). Das in der vorliegenden Arbeit etablierte ISH-Protokoll ist mit denen der gelisteten Studien vergleichbar, weshalb davon auszugehen ist, dass die dort publizierten Sonden auch an das vorliegende Protokoll adaptiert werden könnten. Erste Versuche hierzu lieferten bereits vielversprechende Ergebnisse. Sofern noch keine geeigneten Sonden-Sequenzen für entsprechende Erreger publiziert wurden, können diese, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, anhand verfügbarer Daten in Nukleotidsequenz-Datenbanken (bspw. GenBank des NCBI, USA) entworfen werden.

Ein weiterer Vorteil der ISH ist, dass mit dieser Technik Erreger unabhängig von der Spezies, von welcher das zu untersuchende Gewebe stammt, nachgewiesen werden können. Da für indirekte IHC-Methoden Sekundärantikörper eingesetzt werden, die gegen die Spezies, von der der Primärantikörper stammt, gerichtet sind (meist Maus, Kaninchen, Pferd oder Ziege/Schaf), kann es bei der Verwendung von Geweben der gleichen Tierart zur Bindung der sekundären Antikörper an endogene Immunglobuline und somit zu Hintergrundfärbungen kommen (Fung et al., 1992;

Ramos-Vara, 2005). Dies kann gerade in der Veterinärmedizin eine erhebliche Einschränkung für den immunhistochemischen Nachweis darstellen.

Eine vermehrte Einbindung der In-situ-Hybridisierung als Diagnostikmethode, wäre daher auch für die veterinärpathologische Routinediagnostik wünschenswert. Durch die Verwendung kommerzieller Reagenzien und Pufferlösungen sowie den Einsatz eines In-situ-Hybridisierungsautomaten („Hybridizer“) kann das Verfahren hierfür weiter vereinfacht werden, so dass der Arbeitsaufwand mit dem der IHC vergleichbar ist. In Bezug auf die vorliegende Arbeit wäre insbesondere die Entwicklung weiterer ISH-Sonden für den Nachweis und die Differenzierung verschiedener zystenbildender Kokzidien wie *N. caninum* oder *Sarcocystis* spp. von Interesse. Um die Signalstärke und somit die Sensitivität des ISH-RNA-Nachweises auf FFPE-Gewebe noch zu verbessern, könnten außerdem moderne verzweigte In-situ-Hybridisierungstechniken, wie RNAscope (Advanced Cell Diagnostics, Newark, Kalifornien, USA) erprobt werden (Cassidy und Jones, 2014; Wang et al., 2012). Andere veterinärmedizinisch relevante Erreger, wie beispielsweise *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Palmer et al., 2019) und *Mycoplasma hyorhinis* (Resende et al., 2019), konnten durch die Verwendung dieser Technik bereits nachgewiesen werden.



## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorkommen von *Toxoplasma (T.) gondii* als Aborterreger bei Schafaborten aus dem nordbayerischen Raum zu ermitteln. Dabei sollten verschiedene Nachweismethoden bezüglich ihrer Eignung für die Routinediagnostik miteinander verglichen werden. Ferner sollte *T. gondii* vom nahe verwandten Erreger *Neospora (N.) caninum* differenziert und dessen Vorkommenshäufigkeit im Untersuchungsmaterial bestimmt werden.

Für diesen Zweck wurde das formalin-fixierte, paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebe von 200, in den Jahren 2003 bis 2018 an die Veterinärpathologie des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Erlangen eingesandten Schafaborten histopathologisch, immunhistochemisch und mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf *T. gondii* untersucht. Daneben kam noch eine weitere direkte Nachweismethode, die chromogene In-situ-Hybridisierung (ISH), zum Einsatz, die in der vorliegenden Arbeit speziell für den Nachweis von *T. gondii* etabliert wurde. Die Untersuchung auf *N. caninum* erfolgte mittels real-time PCR. Als Untersuchungsmaterial diente FFPE Eihautgewebe mit Kotyledonen. Im Falle eines positiven Ergebnisses für einen der beiden einzelligen Parasiten wurden die fetalen Organe, soweit vorhanden, histologisch und – bei *T. gondii*-positiven Fällen - auch immunhistologisch und mittels ISH weiter untersucht.

Eine Infektion mit *T. gondii* konnte in neun von 200 (4,5 %) Abortfällen mittels real-time PCR, die als Referenzmethode diente, nachgewiesen werden. Mikroskopisch lag in allen neun Eihäuten eine unterschiedlich stark ausgeprägte multifokale nekrotisierende Plazentitis vor. In sechs der acht zur Verfügung stehenden Gehirne zugehöriger Feten waren charakteristische Läsionen, bestehend aus multifokalen Nekroseherden und/oder Gliaknötchen, zu finden. *T. gondii*-Antigen konnte in den Kotyledonen aller neun Fälle mittels Immunhistochemie (IHC) nachgewiesen werden. In weiteren sieben der 200 untersuchten Fälle ergaben sich fragliche Ergebnisse, die auf unspezifische Anfärbungen im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung zurückzuführen waren. Die Sensitivität der IHC lag damit bei 100 %, ihre Spezifität bei 96–100 %. Die ISH erbrachte in vier der neun *T. gondii*-positiven Eihäute ein positives Ergebnis. Des Weiteren erzielte die Methode in einer *N. caninum*-positiven Eihaut ein falsch-positives Ergebnis. Die Sensitivität der ISH lag bei 44 %, die Spezifität bei 99 %. In den fetalen Organen konnten sowohl mit der

IHC als auch mit der ISH nur sporadisch reaktionslose Gewebezysten (Herzen: 3/7, Lungen: 1/9, Lebern: 1/4) detektiert werden.

Eine Infektion mit *N. caninum* konnte in sieben von 200 (3,5 %) weiteren Abortfällen nachgewiesen werden. Sechs der positiv getesteten Eihäute zeigten eine multifokale nekrotisierende Plazentitis. In allen drei Fällen, in denen zusätzlich beurteilbares fetales Gehirngewebe vorlag, konnten multifokale Nekroseherde und Gliaknötchen festgestellt werden. Außerdem lag in zwei der fünf zur Verfügung stehenden fetalen Herzen eine multifokale gemischtzellige Myokarditis vor. Die IHC auf *T. gondii* zeigte am *N. caninum*-positiven Eihautgewebe keine Kreuzreaktion.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass im Untersuchungszeitraum von 2003 bis 2018 *T. gondii* und *N. caninum* etwa gleich häufig an Schafaborten aus Nordbayern beteiligt waren. *T. gondii* stellte nach *Chlamydia* spp. den zweithäufigsten, *N. caninum* nach den beiden erstgenannten sowie *Coxiella burnetii* den vierthäufigsten Aborterreger im Untersuchungsgut dar. Inwiefern die beiden Protozoen auch Ursache des jeweiligen Abortgeschehens waren, ließ sich insbesondere bei gleichzeitiger Infektion mit weiteren Aborterregern, wie *Chlamydia* spp., nicht immer zweifelsfrei ermitteln.

Die Kombination histologischer Methoden mit der real-time PCR war am besten für den Nachweis von *T. gondii* in Schafaborten geeignet. Mit Hilfe der Histopathologie können Verdachtsfälle ermittelt und anschließend *T. gondii* mittels PCR von *N. caninum* abgegrenzt werden. Für einen ergänzenden morphologischen Nachweis von *T. gondii* in Plazentagewebe empfiehlt sich die IHC. Die ISH führt vor allem bei Vorliegen ausgedehnter Nekrosen und bei fortgeschrittener Auto-/Heterolyse des Untersuchungsmaterials zu falsch-negativen Ergebnissen und ist daher als alleinige Untersuchungsmethode ungeeignet. Im Einzelfall kann sie die real-time PCR jedoch durch die Visualisierung des Erregers zielführend ergänzen.

## VII. SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the occurrence of *Toxoplasma (T.) gondii* in ovine abortions from Northern Bavaria. For this purpose, different detection methods were compared with each other regarding their suitability for routine diagnostics. Furthermore, *T. gondii* was differentiated from the closely related pathogen *Neospora (N.) caninum* and the examined abortion cases were additionally tested for the latter protozoan parasite.

For this purpose, formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue of 200 abortion cases submitted to the department of veterinary pathology of the Bavarian Health and Food Safety Authority (Erlangen) between 2003 and 2018 was examined retrospectively. The presence of *T. gondii* was evaluated histopathologically, by immunohistochemistry (IHC) and real-time polymerase chain reaction (PCR). In addition, a chromogenic in situ hybridization (ISH) assay was established especially for the detection of *T. gondii* within this study. The presence of *N. caninum* was determined by real-time PCR. Primarily, FFPE placental tissue including cotyledons was investigated. In case of a positive test for either *T. gondii* or *N. caninum*, all available organs of the corresponding fetuses were examined histologically. In *T. gondii*-positive cases, this examination included also IHC and ISH staining of tissue sections.

An infection with *T. gondii* was detected in nine of 200 (4.5%) abortion cases by real-time PCR, which served as the reference method. Microscopically, all those nine placentas showed a multifocal necrotizing placentitis of varying degree. In six of eight cases, in which fetal brain tissue was available, characteristic lesions consisting of multifocal necrosis and/or gliosis were present. *T. gondii* antigen was detected in the placental cotyledons of all nine cases by IHC. Inconclusive IHC staining results were observed in another seven of the 200 examined cases. The sensitivity of IHC was 100% and its specificity was 96–100%. A positive ISH result was obtained in four of the nine *T. gondii*-positive placentas. Moreover, this method revealed a false-positive result in a *N. caninum*-positive placental sample. Therefore, the sensitivity of ISH was 44% and the specificity was 99%. In fetal organs, tissue cysts were detected only sporadically by IHC and ISH (heart tissue: 3/7, lung tissue: 1/9, liver tissue: 1/4).

An infection with *N. caninum* was detected in seven of 200 (3.5%) cases. Six of them showed a multifocal necrotizing placentitis. Suitable brain tissue was available only in three cases and exhibited multifocal necrosis and gliosis. Moreover, two of five available fetal hearts showed a multifocal mixed inflammatory cell myocarditis. *T. gondii*-IHC revealed no cross-reactivity on *N. caninum*-positive placental tissue.

The results of the present study demonstrate that *T. gondii* and *N. caninum* were involved almost equally in ovine abortions from Northern Bavaria over the period examined. *T. gondii* was the second most common detected abortifacient agent after *Chlamydia* spp., followed by *Coxiella burnetii* and *N. caninum*, which was the fourth most common identified pathogen. However, especially in cases where multiple abortion causing agents were identified, the actual contribution of the protozoan parasites remained unclear.

A combination of histological methods combined with real-time PCR was most suitable for the detection of *T. gondii* in abortion of sheep. Suspected cases can be identified by means of histopathological examination, followed by the differentiation of *T. gondii* from *N. caninum* by PCR. In placental tissue sections, IHC may serve as an additional method for the morphological detection of *T. gondii*. Due to possible false-negative results, the exclusive usage of ISH is not recommended for the identification of *T. gondii* especially in tissue with extensive necrosis or autolytic alterations. However, ISH combined with real-time PCR may improve the evaluation by visualizing the parasite within tissue sections in individual cases.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, Mcmanus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A und Spiegel FW (2012): The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*; 59: 429-493.

Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières MH, Thulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P und Dardé ML (2002): Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*; 186: 684-689.

Andres TL, Dorman SA, Winn W Jr, Trainer TD und Perl DP (1981): Immunohistochemical demonstration of *Toxoplasma gondii*. *Am J Clin Pathol*; 75: 431-434.

Arber JM, Weiss LM, Chang KL, Battifora H und Arber DA (1997): The effect of decalcification on in situ hybridization. *Mod Pathol*; 10: 1009-1014.

Arnemann J (2019): Nested-PCR. In: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 3. Aufl. Gressner AM und Arndt T (Hg.); Berlin, Heidelberg: Springer: 1736-1736.

Asadpour R, Jafari-Joozani R und Salehi N (2013): Detection of *Neospora caninum* in ovine abortion in Iran. *J Parasit Dis*; 37: 105-109.

Ashburn D (1992): History and general epidemiology. In: *Human Toxoplasmosis*. Ho-Yen DO und Joss AWL (Hg.); Oxford: Oxford University Press: 1-25.

Aslanzadeh J (2004): Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Ann Clin Lab Sci*; 34: 389-396.

Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V und Carme B (1999): Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand J Infect Dis*; 31: 305-309.

Bayerische Vermessungsverwaltung - [www.geodaten.bayern.de](http://www.geodaten.bayern.de) (2020)  
(<https://www.ldbv.bayern.de/produkte/weitere/opendata.html> – Verwaltungsgebiete)

Benavides J, Fernández M, Castaño P, Ferreras MC, Ortega-Mora L und Pérez V (2017): Ovine Toxoplasmosis: A New Look at its Pathogenesis. *J Comp Pathol*; 157: 34-38.

Beverley JK, Watson WA und Payne JM (1971): The pathology of the placenta in ovine abortion due to toxoplasmosis. *Vet Rec*; 88: 124-128.

Binanti D, Mostegl MM, Weissenbacher-Lang C, Nedorost N und Weissenböck H (2014): Detection of *Pneumocystis* infections by in situ hybridization in lung samples of Austrian pigs with interstitial pneumonia. *Med Mycol*; 52: 196-201.

Blader IJ und Saeij JP (2009): Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS*; 117: 458-476.

Borel N, Frey CF, Gottstein B, Hilbe M, Pospischil A, Franzoso FD und Waldvogel A (2014): Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. *Vet J*; 200: 218-229.

Borst A, Box AT und Fluit AC (2004): False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 23: 289-299.

Brodie TA, Duncan JL und Harvey MJ (1983): Role of enzootic abortion and toxoplasmosis in an outbreak of abortion in a Scottish sheep flock. *Vet Rec*; 113: 437-440.

Burg JL, Grover CM, Pouletty P und Boothroyd JC (1989): Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol; 27: 1787-1792.

Bussolati G und Leonardo E (2008): Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry. J Clin Pathol; 61: 1184-1192.

Buxton D (1998): Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. Vet Res; 29: 289-310.

Buxton D und Finlayson J (1986): Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. J Comp Pathol; 96: 319-333.

Buxton D, Gilmour JS, Angus KW, Blewett DA und Miller JK (1982): Perinatal changes in lambs infected with *Toxoplasma gondii*. Res Vet Sci; 32: 170-176.

Buxton D und Innes EA (1995): A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. Parasitology; 110 (Suppl 1): S11-16.

Buxton D, Maley SW, Thomson KM, Trees AJ und Innes EA (1997): Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. J Comp Pathol; 117: 1-16.

Buxton D, Maley SW, Wright S, Thomson KM, Rae AG und Innes EA (1998): The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. J Comp Pathol; 118: 267-279.

Buxton D, Maley SW, Wright SE, Rodger S, Bartley P und Innes EA (2007): *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. Vet Parasitol; 149: 25-28.

Buxton D, Rodger S, Maley S und Wright S (2006): Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission. *Small Rumin Res*; 62: 43-46.

Buxton D und Rodger SM (2007): Toxoplasmosis and Neosporosis. In: *Diseases of Sheep*. 4. Aufl. Aitken ID (Hg.); Oxford: Blackwell Publishing: 112-119.

Cartun RW, Taylor CR und Dabbs DJ (2018): Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization. In: *Diagnostic Immunohistochemistry: Teranostic and Genomic Applications*. 5. Aufl. Dabbs DJ (Hg.); Philadelphia, PA: Elsevier: 1-46.

Cassidy A und Jones J (2014): Developments in in situ hybridisation. *Methods*; 70: 39-45.

Cenci-Goga BT, Ciampelli A, Sechi P, Veronesi F, Moretta I, Cambiotti V und Thompson PN (2013): Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy. *BMC Vet Res*; 9: 25.

Chanton-Greutmann H, Thoma R, Corboz L, Borel N und Pospischil A (2002): Aborte beim kleinen Wiederkäuer in der Schweiz: Untersuchungen während zwei Ablammperioden (1996–1998) unter besonderer Beachtung des Chlamydienabortes. *Schweiz Arch Tierheilkd*; 144: 483-492.

Chessa G, Chisu V, Porcu R und Masala G (2014): Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* Type II in sheep abortion in Sardinia, Italy. *Parasite*; 21: 6.

Christie GA (1967): Comparative histochemical distribution of glycogen and alkaline phosphatases in the placenta. *Histochemie*; 9: 93-116.

Chvala S, Fragner K, Hackl R, Hess M und Weissenböck H (2006): *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser f. domestica*) detected by in-situ hybridization. *J Comp Pathol*; 134: 211-218.



Chvala S, Kolodziejek J, Nowotny N und Weissenböck H (2004): Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. J Comp Pathol; 131: 176-185.

Conley FK und Jenkins KA (1981): Immunohistological study of the anatomic relationship of toxoplasma antigens to the inflammatory response in the brains of mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. Infect Immun; 31: 1184-1192.

Conley FK, Jenkins KA und Remington JS (1981): *Toxoplasma gondii* infection of the central nervous system. Use of the peroxidase-antiperoxidase method to demonstrate toxoplasma in formalin fixed, paraffin embedded tissue sections. Hum Pathol; 12: 690-698.

Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE und Dunn DT (2000): Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. BMJ; 321: 142-147.

Coons AH, Creech HJ und Jones RN (1941): Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc Soc Exp Biol Med; 47: 200-202.

Da Silva Pde C, Shiraishi CS, Silva AV, Gonçalves GF, Sant'Ana Dde M und Araújo EJ (2010): *Toxoplasma gondii*: a morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. Exp Parasitol; 125: 380-383.

Dabritz HA, Miller MA, Atwill ER, Gardner IA, Leutenegger CM, Melli AC und Conrad PA (2007): Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. J Am Vet Med Assoc; 231: 1676-1684.

Deplazes P, Eckert J, von Samson-Himmelstjerna G und Zahner H (2013): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 3. Aufl; Stuttgart: Enke.

Desmonts G, Couvreur J, Alison F, Baudelot J, Gerbeaux J und Lelong M (1965): [Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection]. Rev Fr Études Clin Biol; 10: 952-958. Französisch.

Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Hesselink JW und Wouda W (2002): Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. Vet Parasitol; 105: 99-104.

Dijkstra T, Eysker M, Schares G, Conraths FJ, Wouda W und Barkema HW (2001): Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. Int J Parasitol; 31: 747-752.

Dilbeck PM und McElwain TF (1994): Immunohistochemical detection of *Coxiella burnetti* in formalin-fixed placenta. J Vet Diagn Invest; 6: 125-127.

Dinhopl N, Mostegl MM, Richter B, Nedorost N, Maderner A, Fragner K und Weissenböck H (2011a): Application of in-situ hybridization for the detection and identification of avian malaria parasites in paraffin wax-embedded tissues from captive penguins. Avian Pathol; 40: 315-320.

Dinhopl N, Mostegl MM, Richter B, Nedorost N, Maderner A, Fragner K und Weissenböck H (2011b): In situ hybridisation for the detection of *Leishmania* species in paraffin wax-embedded canine tissues using a digoxigenin-labelled oligonucleotide probe. Vet Rec; 169: 525.

Dobrowolski JM und Sibley LD (1996): *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. Cell; 84: 933-939.

Drdlicek J (2009): Untersuchungen zum Vorkommen von *Chlamydiaceae* fam. und *Coxiella burnetii* als Aborterreger bei Rind und Schaf in Nordbayern. Diss. med. vet. Institut für Veterinär-Pathologie, Fachbereich Veterinärmedizin. Justus-Liebig-Universität Gießen.

Dubey JP (1996): Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. J Parasitol; 82: 957-961.

Dubey JP (1998): *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. J Parasitol; 84: 862-865.

Dubey JP (2001): Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. J Parasitol; 87: 215-219.

Dubey JP (2002): Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. J Parasitol; 88: 713-717.

Dubey JP (2004): Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol; 126: 57-72.

Dubey JP (2005): Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: in vivo stage conversion and strain variation. Vet Parasitol; 133: 289-298.

Dubey JP (2009): Toxoplasmosis in sheep—the last 20 years. Vet Parasitol; 163: 1-14.

Dubey JP (2010a): General Biology. In: Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2. Aufl. Dubey JP (Hg.); Boca Raton, FL: CRC Press: 1-72.

Dubey JP (2010b): Toxoplasmosis in Humans (*Homo sapiens*) In: Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2. Aufl. Dubey JP (Hg.); Boca Raton, FL: CRC Press: 73-93.

Dubey JP (2010c): Toxoplasmosis in Sheep (*Ovis aries*). In: Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2. Aufl. Dubey JP (Hg.); Boca Raton, FL: CRC Press: 119-136.

Dubey JP (2010d): Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2. Aufl. Boca Raton, FL: CRC Press.

Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkås I, Björkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, McAllister MM, Modrý D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJ und Lindsay DS (2002): Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. Int J Parasitol; 32: 929-946.

Dubey JP, Emond JP, Desmonts G und Anderson WR (1987): Serodiagnosis of postnatally and prenatally induced toxoplasmosis in sheep. Am J Vet Res; 48: 1239-1243.

Dubey JP und Frenkel JK (1972): Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J Protozool; 19: 155-177.

Dubey JP und Frenkel JK (1976): Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. J Protozool; 23: 537-546.

Dubey JP und Kirkbride CA (1989): Enzootic toxoplasmosis in sheep in north-central United States. J Parasitol; 75: 673-676.

Dubey JP und Kirkbride CA (1990): Toxoplasmosis and other causes of abortions in sheep from north central United States. J Am Vet Med Assoc; 196: 287-290.

Dubey JP und Lindsay DS (1990): *Neospora caninum* induced abortion in sheep. J Vet Diagn Invest; 2: 230-233.

Dubey JP, Lindsay DS und Speer CA (1998): Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev; 11: 267-299.

Dubey JP, Miller NL und Frenkel JK (1970a): Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol; 56: 447-456.

Dubey JP, Miller NL und Frenkel JK (1970b): The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. J Exp Med; 132: 636-662.

Dubey JP, Schares G und Ortega-Mora LM (2007): Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev; 20: 323-367.

Dubey JP, Sonn RJ, Hedstrom O, Snyder SP und Lassen ED (1990): Serologic and histologic diagnosis of toxoplasmic abortions in sheep in Oregon. J Am Vet Med Assoc; 196: 291-294.

Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OC und Blixt JA (1997): Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. J Parasitol; 83: 870-882.

Duncanson P, Terry RS, Smith JE und Hide G (2001): High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. Int J Parasitol; 31: 1699-1703.

Elias JM (2003): Immunohistochemical methods. In: Immunohistopathology: A Practical Approach to Diagnosis. 2. Aufl. Elias JM (Hg.); Chicago, IL: ASCP Press: 1-110.

Ellis J, Luton K, Baverstock PR, Brindley PJ, Nimmo KA und Johnson AM (1994): The phylogeny of *Neospora caninum*. Mol Biochem Parasitol; 64: 303-311.

Ellis JT, Amoyal G, Ryce C, Harper PA, Clough KA, Homan WL und Brindley PJ (1998): Comparison of the large subunit ribosomal DNA of *Neospora* and *Toxoplasma* and development of a new genetic marker for their differentiation based on the D2 domain. Mol Cell Probes; 12: 1-13.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, III und Smith TF (2006): Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev; 19: 165-256.

Evans HE und Sack WO (1973): Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. Anat Histol Embryol; 2: 11-45.

Faull WB, Clarkson MJ und Winter AC (1986): Toxoplasmosis in a flock of sheep: some investigations into its source and control. Vet Rec; 119: 491-493.

Ferguson DJ und Dubremetz JF (2014): The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods. 2. Aufl. Weiss LM und Kim K (Hg.); London, Waltham, San Diego: Academic Press:19-59.

Ferguson DJ und Hutchison WM (1987a): The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol; 411: 39-43.

Ferguson DJ und Hutchison WM (1987b): An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitol Res; 73: 483-491.

Fernández-Escobar M, Calero-Bernal R, Benavides J, Regidor-Cerrillo J, Guerrero-Molina MC, Gutiérrez-Expósito D, Collantes-Fernández E und Ortega-Mora LM (2020): Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in Spanish sheep flocks. Parasit Vectors; 13: 396.

FLI (2019): *Toxoplasma gondii*. Amtliche Methode und Falldefinition (Stand: 21.10.2019) ([https://www.openagrar.de/receive/openagrar\\_mods\\_00054073](https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00054073))

FLI (2020): Liste der nach § 11 Abs. 2 TierGesG zugelassenen Mittel. (Stand: 30.09.2020) ([https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Service/Zulassungsstelle/deutsch/02\\_d\\_Zul\\_Mittel.pdf](https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Service/Zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.pdf))

Frenkel JK (1973): *Toxoplasma* in and around Us. BioScience; 23: 343-352.

Frenkel JK, Dubey JP und Miller NL (1970): *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science; 167: 893-896.

Freyre A, Dubey JP, Smith DD und Frenkel JK (1989): Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. J Parasitol; 75: 750-755.

Fritschy JM (2008): Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. Eur J Neurosci; 28: 2365-2370.

Fung KM, Messing A, Lee VM und Trojanowski JQ (1992): A novel modification of the avidin-biotin complex method for immunohistochemical studies of transgenic mice with murine monoclonal antibodies. J Histochem Cytochem; 40: 1319-1328.

Gross U, Bohne W, Soete M und Dubremetz JF (1996): Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Today; 12: 30-33.

Gutierrez J, O'Donovan J, Proctor A, Brady C, Marques PX, Worrall S, Nally JE, McElroy M, Bassett H, Fagan J, Maley S, Buxton D, Sammin D und Markey BK (2012): Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of toxoplasmosis and enzootic abortion of ewes. J Vet Diagn Invest; 24: 846-854.

Gutierrez J, O'Donovan J, Williams E, Proctor A, Brady C, Marques PX, Worrall S, Nally JE, McElroy M, Bassett H, Sammin D, Buxton D, Maley S und Markey BK (2010): Detection and quantification of *Toxoplasma gondii* in ovine maternal and foetal tissues from experimentally infected pregnant ewes using real-time PCR. Vet Parasitol; 172: 8-15.

Hartley W und Kater JC (1963): The pathology of *Toxoplasma* infection in the pregnant ewe. Res Vet Sci; 4: 326-336.

Hartley WJ, Jebson JL und McFarlane D (1954): New Zealand type II abortion in ewes. Aust Vet J; 30: 216-218.

Hartley WJ und Marshall SC (1957): Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. N Z Vet J; 5: 119-124.

Hässig M, Sager H, Reitt K, Ziegler D, Strabel D und Gottstein B (2003): *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. Vet Parasitol; 117: 213-220.

Hayat MA (2002): Antigens and Antibodies. In: Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods: For Light and Electron Microscopy. Hayat MA (Hg.); New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers: 31-51.

Hayden RT, Isotalo PA, Parrett T, Wolk DM, Qian X, Roberts GD und Lloyd RV (2003): In situ hybridization for the differentiation of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Pseudallescheria* species in tissue section. Diagn Mol Pathol; 12: 21-26.

Hayden RT, Qian X, Roberts GD und Lloyd RV (2001): In situ hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue section. Diagn Mol Pathol; 10: 15-23.

Hazlett MJ, McDowall R, DeLay J, Stalker M, McEwen B, Van Dreumel T, Spinato M, Binnington B, Slavic D, Carman S und Cai HY (2013): A prospective study of sheep and goat abortion using real-time polymerase chain reaction and cut point estimation shows *Coxiella burnetii* and *Chlamydophila abortus* infection concurrently with other major pathogens. J Vet Diagn Invest; 25: 359-368.

Hill D und Dubey JP (2002): *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect; 8: 634-640.

Hill DE, Chirukandoth S und Dubey JP (2005): Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev; 6: 41-61.

Hinić V, Brodard I, Thomann A, Holub M, Miserez R und Abril C (2009): IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. BMC Vet Res; 5: 22.



Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H und Beer M (2006): A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods*; 136: 200-209.

Holmdahl OJ, Mattsson JG, Uggla A und Johansson KE (1994): The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiol Lett*; 119: 187-192.

Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J und Verschueren H (2000): Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol*; 30: 69-75.

Honoré S, Couvelard A, Garin YJ, Bedel C, Hénin D, Dardé ML und Derouin F (2000): Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients. *Pathol Biol (Paris)*; 48: 541-547.

Howe DK und Sibley LD (1995): *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*; 172: 1561-1566.

Howe L, Collett MG, Pattison RS, Marshall J, West DM und Pomroy WE (2012): Potential involvement of *Neospora caninum* in naturally occurring ovine abortions in New Zealand. *Vet Parasitol*; 185: 64-71.

Howe L, West DM, Collett MG, Tattersfield G, Pattison RS, Pomroy WE, Kenyon PR, Morris ST und Williamson NB (2008): The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the southern North Island of New Zealand. *Small Rumin Res*; 75: 115-122.

Hughes JM, Williams RH, Morley EK, Cook DA, Terry RS, Murphy RG, Smith JE und Hide G (2006): The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitology*; 132: 29-36.

Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Barandika J und García-Pérez AL (2001): Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet Parasitol*; 102: 17-27.

Hutchinson JP, Wear AR, Lambton SL, Smith RP und Pritchard GC (2011): Survey to determine the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in British sheep flocks. *Vet Rec*; 169: 582.

Hutchison WM (1965): Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*; 206: 961-962.

Hutchison WM, Dunachie JF, Siim JC und Work K (1969): Life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Br Med J*; 4: 806.

Hutchison WM, Dunachie JF, Siim JC und Work K (1970): Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Br Med J*; 1: 142-144.

Hutchison WM, Dunachie JF, Work K und Siim JC (1971): The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 65: 380-399.

Innes EA, Bartley PM, Buxton D und Katzer F (2009): Ovine toxoplasmosis. *Parasitology*; 136: 1887-1894.

Innes EA, Hamilton C, Garcia JL, Chryssafidis A und Smith D (2019): A one health approach to vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Food Waterborne Parasitol*; 15: e00053.

Ito S, Tsunoda K, Shimada K, Taki T und Matsui T (1975): Disinfectant effects of several chemicals against *Toxoplasma* oocysts. *Nihon Juigaku Zasshi*; 37: 229-234.

Jacobs L, Remington JS und Melton ML (1960): The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*; 46: 11-21.

Jenkins MC, Ellis JT, Liddell S, Ryce C, Munday BL, Morrison DA und Dubey JP (1999): The relationship of *Hammondia hammondi* and *Sarcocystis mucosa* to other heteroxenous cyst-forming coccidia as inferred by phylogenetic analysis of the 18S SSU ribosomal DNA sequence. *Parasitology*; 119 (Pt 2): 135-142.

Jensen E (2014): Technical review: In situ hybridization. *Anat Rec (Hoboken)*; 297: 1349-1353.

Jin L und Lloyd RV (1997): In situ hybridization: methods and applications. *J Clin Lab Anal*; 11: 2-9.

Jokelainen P, Näreaho A, Knaapi S, Oksanen A, Rikula U und Sukura A (2010): *Toxoplasma gondii* in wild cervids and sheep in Finland: north-south gradient in seroprevalence. *Vet Parasitol*; 171: 331-336.

Jones JL und Dubey JP (2012): Foodborne toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*; 55: 845-851.

Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J und Gibbs R (2001): Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv*; 56: 296-305.

Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A und Eng J (1996): Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol*; 144: 405-412.

Katzer F, Brülisauer F, Collantes-Fernández E, Bartley PM, Burrells A, Gunn G, Maley SW, Cousens C und Innes EA (2011): Increased *Toxoplasma gondii* positivity relative to age in 125 Scottish sheep flocks; evidence of frequent acquired infection. *Vet Res*; 42: 121.

Kirkbride CA (1993): Diagnoses in 1,784 ovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Invest*; 5: 398-402.

Kirkbride CA, Dubey JP und Libal MC (1992): Effect of feeding lasalocid to pregnant ewes experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Vet Parasitol; 44: 299-303.

Klun I, Djurković-Djaković O, Katić-Radivojević S und Nikolić A (2006): Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. Vet Parasitol; 135: 121-131.

Kuticic V und Wikerhauser T (1996): Studies of the effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts. Curr Top Microbiol Immunol; 219: 261-265.

Lefebvre RC (2015): Fetal mummification in the major domestic species: current perspectives on causes and management. Vet Med (Auckl); 6: 233-244.

Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D und Leitch IJ (1994): *In situ*-Hybridisierung. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

Levine ND (1961): *Sarcocystis*, *Toxoplasma* and related protozoa. In: Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. Levine ND (Hg.); Minneapolis, MN: Burgess Publishing Company: 317–346.

Levine ND (1970): Taxonomy of the sporozoa. J Parasitol; 56: 208-209.

Levine ND (1977): Taxonomy of *Toxoplasma*. J Protzool; 24: 36-41.

Levine ND (1988): The Protozoan Phylum Apicomplexa: Vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press.

Li XL, Wei HX, Zhang H, Peng HJ und Lindsay DS (2014): A meta analysis on risks of adverse pregnancy outcomes in *Toxoplasma gondii* infection. PLoS One; 9: e97775.

Liesenfeld O, Wong SY und Remington JS (1999): Toxoplasmosis in the setting of AIDS. In: Textbook of AIDS Medicine. 2. Aufl. Merigan TC, Bartlett JG und Bolognesi D (Hg.); Baltimore, MD: Williams & Wilkins: 225-259.

Liu C, Ke O, Tan D und Zhang Z (1998): [Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human lymph node tissue by in situ hybridization]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi; 16: 380-383. Chinesisch.

Liu Q, Wang ZD, Huang SY und Zhu XQ (2015): Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. Parasit Vectors; 8: 292.

Ma XM, Meng XL, Yin GR, Liu HL und Shen JY (2008): [Dynamic observation of attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to intestinal mucosa in BALB/c mice by chromogenic in situ hybridization targeting SAG2 mRNA]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi; 26: 272-276. Chinesisch.

Maenz M, Schluter D, Liesenfeld O, Schares G, Gross U und Pleyer U (2014): Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. Prog Retin Eye Res; 39: 77-106.

Masala G, Porcu R, Daga C, Denti S, Canu G, Patta C und Tola S (2007): Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. J Vet Diagn Invest; 19: 96-98.

Masala G, Porcu R, Madau L, Tanda A, Ibba B, Satta G und Tola S (2003): Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. Vet Parasitol; 117: 15-21.

McAllister MM, McGuire AM, Jolley WR, Lindsay DS, Trees AJ und Stobart RH (1996a): Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. Vet Pathol; 33: 647-655.

McAllister MM, Parmley SF, Weiss LM, Welch VJ und McGuire AM (1996b): An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. J Parasitol; 82: 354-355.

McAuley JB (2014): Congenital Toxoplasmosis. J Pediatric Infect Dis Soc; 3 (Suppl 1): S30-35.

McColgan C, Buxton D und Blewett D (1988): Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. Vet Rec; 123: 467-470.

Meixner N, Sommer MF, Scuda N, Matiasek K und Müller M (2020): Comparative aspects of laboratory testing for the detection of *Toxoplasma gondii* and its differentiation from *Neospora caninum* as the etiologic agent of ovine abortion. J Vet Diagn Invest; 32: 898-907.

Menezes RC, Figueiredo FB, Wise AG, Madeira MF, Oliveira RV, Schubach TM, Kiupel M und Langohr IM (2013): Sensitivity and specificity of in situ hybridization for diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. J Clin Microbiol; 51: 206-211.

Meyerholz DK und Beck AP (2018): Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research. Lab Invest; 98: 844-855.

Miller NL, Frenkel JK und Dubey JP (1972): Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. J Parasitol; 58: 928-937.

Moeller RB Jr (2012): Disorders of Sheep and Goats. In: Kirkbride's Diagnosis of Abortion and Neonatal Loss in Animals. 4. Aufl. Njaa BL (Hg.); Ames, IA: Wiley-Blackwell: 49-87.

Montone KT (1994): In situ hybridization for ribosomal RNA sequences: a rapid sensitive method for diagnosis of infectious pathogens in anatomic pathology substrates. *Acta Histochem Cytochem*; 27: 601-606.

Montone KT, Livolsi VA, Lanza DC, Kennedy DW, Palmer J, Chiu AG, Feldman MD, Loevner LA und Nachamkin I (2011): In situ hybridization for specific fungal organisms in acute invasive fungal rhinosinusitis. *Am J Clin Pathol*; 135: 190-199.

Montoya JG (2002): Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis*; 185 (Suppl 1): S73-82.

Montoya JG und Liesenfeld O (2004): Toxoplasmosis. *Lancet*; 363: 1965-1976.

Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J und Ortega-Mora LM (2012): Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol*; 187: 312-318.

Mostegl MM, Richter B, Dinhopf N und Weissenböck H (2011): Influence of prolonged formalin fixation of tissue samples on the sensitivity of chromogenic in situ hybridization. *J Vet Diagn Invest*; 23: 1212-1216.

Mugridge NB, Morrison DA, Heckeroth AR, Johnson AM und Tenter AM (1999): Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*; 29: 1545-1556.

Navarro JA, Ortega N, Buendia AJ, Gallego MC, Martinez CM, Caro MR, Sánchez J und Salinas J (2009): Diagnosis of placental pathogens in small ruminants by immunohistochemistry and PCR on paraffin-embedded samples. *Vet Rec*; 165: 175-178.

Nicolle C und Manceaux L (1908): Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Hebd Séances Acad Sci*; 147: 763-766.

Nicolle C und Manceaux L (1909): Sur un protozoaire nouveau du gondi. C R Hebd Séances Acad Sci; 148: 369-372.

Njaa BL (2012): Summary Tables of Diagnostic Tests for Infectious Causes of Abortion and Neonatal Loss. In: Kirkbride's Diagnosis of Abortion and Neonatal Loss in Animals. 4. Aufl. Njaa BL (Hg.); Ames, IA: Wiley-Blackwell: 225-232

O'Donovan J, Proctor A, Gutierrez J, Worrell S, Nally J, Marques P, Brady C, McElroy M, Sammin D, Buxton D, Maley S, Bassett H und Markey B (2012): Distribution of lesions in fetal brains following experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*. Vet Pathol; 49: 462-469.

Okello JB, Zurek J, Devault AM, Kuch M, Okwi AL, Sewankambo NK, Bimenya GS, Poinar D und Poinar HN (2010): Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. Anal Biochem; 400: 110-117.

Overbergh L, Vig S, Coun F und Mathieu C (2017): Quantitative Polymerase Chain Reaction. In: Molecular Diagnostics. 3. Aufl. Patrinos GP, Ansorge WJ und Danielson PB (Hg.): London, San Diego, Cambridge: Academic Press: 41-58.

Owen MR, Clarkson MJ und Trees AJ (1998): Diagnosis of toxoplasma abortion in ewes by polymerase chain reaction. Vet Rec; 142: 445-448.

Owen MR und Trees AJ (1999): Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. J Parasitol; 85: 382-384.

Palmer MV, Kanipe C, Cox R, Robbe-Austerman S und Thacker TC (2019): Characteristics of subclinical *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in a captive white-tailed deer herd. J Vet Diagn Invest; 31: 844-851.

Park CS, Kim J und Montone KT (1997): Detection of *Aspergillus* ribosomal RNA using biotinylated oligonucleotide probes. Diagn Mol Pathol; 6: 255-260.



Pennick KE, McKnight CA, Patterson JS, Latimer KS, Maes RK, Wise AG und Kiupel M (2012): Diagnostic sensitivity and specificity of in situ hybridization and immunohistochemistry for Eastern equine encephalitis virus and West Nile virus in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue of horses. *J Vet Diagn Invest*; 24: 333-338.

Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Pérez-Pérez V, Alvarez- García G, Collantes-Fernández E und Ortega-Mora LM (2004): Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet Parasitol*; 121: 33-43.

Plagemann O (1989): Die häufigsten infektiösen Abortursachen beim Schaf in Nordbayern unter besonderer Berücksichtigung der Chlamydien- und Salmonelleninfektionen. *Tierärztl Prax*; 17: 145-148.

Plant JW, Richardson N und Moyle GG (1974): *Toxoplasma* infection and abortion in sheep associated with feeding of grain contaminated with cat faeces. *Aust Vet J*; 50: 19-21.

Pleyer U, Gross U, Schluter D, Wilking H und Seeber F (2019): Toxoplasmosis in Germany. *Dtsch Arztebl Int*; 116: 435-444.

Pleyer U, Torun N und Liesenfeld O (2007): Okuläre Toxoplasmose. *Ophthalmologe*; 104: 603-616.

Ponder BA und Wilkinson MM (1981): Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*; 29: 981-984.

Porter SB und Sande MA (1992): Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*; 327: 1643-1648.

Ramos-Vara JA (2005): Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*; 42: 405-426.

Razmi G und Naseri Z (2017): Molecular detection of *Neospora caninum* infection in ovine aborted fetuses in the Mashhad area, Iran. Ann Parasitol; 63: 45-47.

Remington JS, McLeod R, Thulliez P und Desmonts G (2006): Toxoplasmosis. In: Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 6. Aufl. Remington JS, Klein JO, Wilson CB und Baker CJ (Hg.); Philadelphia, PA: Saunders: 947-1091.

Resende TP, Pieters M und Vannucci FA (2019): Swine conjunctivitis outbreaks associated with *Mycoplasma hyorhinis*. J Vet Diagn Invest; 31: 766-769.

Richter B, Kubber-Heiss A, Weissenböck H und Schmidt P (2008): Detection of *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. and *Monocercomonas* spp. in the gastrointestinal tract of snakes by in-situ hybridization. J Comp Pathol; 138: 63-71.

RKI (2019): Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018. ([https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2018.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2018.pdf?__blob=publicationFile))

RKI (2020): RKI-Ratgeber - Toxoplasmose (abgerufen am 16.07.2020); [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Toxoplasmose.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Toxoplasmose.html)

Robert-Gangneux F und Dardé ML (2012): Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev; 25: 264-296.

Sabin AB (1939): Biological and immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin. Proc Soc Exp Biol Med; 41: 75-80.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science; 239: 487-491.

Schnydrig P, Vidal S, Brodard I, Frey C, Posthaus H, Perreten V und Rodriguez-Campos S (2017): Bacterial, fungal, parasitological and pathological analyses of abortions in small ruminants from 2012-2016. *Schweiz Arch Tierheilkd*; 159: 647-656.

Scholtyssek E und Piekarski G (1965): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Merozoiten von Eimerien (*Eimeria perforans* und *E. stiedae*) und *Toxoplasma gondii*: Zur systematischen Stellung von *T. gondii*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*; 26: 91-115.

Schoondermark-Van De Ven E, Galama J, Camps W, Meuwissen J und Melchers W (1993): Diagnosis of *Toxoplasma Gondii* Infections by Molecular Detection. In: *Toxoplasmosis*. Smith JE (Hg); NATO ASI Series Vol. 78. Berlin, Heidelberg: Springer: 199-207.

Seefeldt SL, Kirkbride CA und Dubey JP (1989): Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody test, and direct agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally aborted ovine fetuses. *J Vet Diagn Invest*; 1: 124-127.

Seineke P (1996): Seroprävalenz von Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* bei Schafen, Ziegen und Schweinen in Niedersachsen. Diss. med. vet. Tierärztliche Hochschule. Hannover.

Sheffield HG und Melton ML (1968): The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*; 54: 209-226.

Sheffield HG und Melton ML (1970): *Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. *Science*; 167: 892-893.

Sibley LD und Boothroyd JC (1992): Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*; 359: 82-85.

Sibley LD und Howe DK (1996): Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr Top Microbiol Immunol*; 219: 3-15.

Skjerve E, Waldeland H, Nesbakken T und Kapperud G (1998): Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. *Prev Vet Med*; 35: 219-227.

Sörgel SC (2008): Beteiligung von *Neospora caninum* bei Rinderaborten in Nordbayern. Diss. med. vet. Institut für Tierpathologie, Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Speer CA und Dubey JP (1998): Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology*; 116 (Pt 1): 35-42.

Steuber S, Niu A, Bauer C, Reetz J, Roth A und Janitschke K (1995): Der Nachweis von *Toxoplasma gondii* in Abortgeweben vom Schaf mittels der Polymerase-Kettenreaktion. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*; 102: 91-93.

Sting R, Nagel C und Steng G (1997): Die Bedeutung infektiöser Abortursachen in Schafherden im nördlichen Baden-Württemberg unter besonderer Berücksichtigung von *Chlamydia psittaci*. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*; 110: 5-11.

Sundermann CA, Estridge BH, Branton MS, Bridgman CR und Lindsay DS (1997): Immunohistochemical diagnosis of *Toxoplasma gondii*: potential for cross-reactivity with *Neospora caninum*. *J Parasitol*; 83: 440-443.

Susta L, Torres-Velez F, Zhang J und Brown C (2009): An in situ hybridization and immunohistochemical study of cytauxzoonosis in domestic cats. *Vet Pathol*; 46: 1197-1204.

Szeredi L und Bacsadi A (2002): Detection of *Chlamydophila* (*Chlamydia*) *abortus* and *Toxoplasma gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by the streptavidin-biotin method. *J Comp Pathol*; 127: 257-263.

Szeredi L, Janosi S, Tenk M, Tekes L, Bozso M, Deim Z und Molnar T (2006): Epidemiological and pathological study on the causes of abortion in sheep and goats in Hungary (1998-2005). *Acta Vet Hung*; 54: 503-515.

Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ und Isola J (2000): Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol*; 157: 1467-1472.

Tenter AM, Barta JR, Beveridge I, Duszynski DW, Mehlhorn H, Morrison DA, Thompson RA und Conrad PA (2002): The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int J Parasitol*; 32: 595-616.

Tenter AM und Fehlhaver K (2002): Toxoplasmose: eine lebensmittelübertragene Parasitose. *Bundesgesundheitsbl.*; 45: 549-555.

Tenter AM, Heckeroth AR und Weiss LM (2000): *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*; 30: 1217-1258.

Tenter AM und Johnson AM (1997): Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. *Adv Parasitol*; 39: 69-139.

Tzanidakis N, Maksimov P, Conraths FJ, Kiossis E, Brozos C, Sotiraki S und Schares G (2012): *Toxoplasma gondii* in sheep and goats: seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. *Vet Parasitol*; 190: 340-348.

Uggla A, Sjöland L und Dubey JP (1987): Immunohistochemical diagnosis of toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. *Am J Vet Res*; 48: 348-351.

Vesco G, Buffolano W, La Chiusa S, Mancuso G, Caracappa S, Chianca A, Villari S, Currò V, Liga F und Petersen E (2007): *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Vet Parasitol*; 146: 3-8.

Votýpka J, Modrý D, Oborník M, Šlapeta J und Lukeš J (2016): Apicomplexa. In: Handbook of the Protists. Archibald JM, Simpson AGB, Slamovits CH, Margulis L, Melkonian M, Chapman DJ und Corliss JO (Hg.); Cham, Schweiz: Springer: 1-58. ([https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6\\_20-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_20-1))

Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo HT, Ma XJ und Luo Y (2012): RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. J Mol Diagn; 14: 22-29.

Weinman D und Chandler AH (1954): Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. Proc Soc Exp Biol Med; 87: 211-216.

Weiss LM und Kim K (2000): The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Front Biosci; 5: D391-405.

Weissenböck H, Mrakovcic M, Ladinig A und Fragner K (2007): In situ hybridization for *Lawsonia intracellularis*–specific 16s rRNA sequence in paraffin-embedded tissue using a digoxigenin-labeled oligonucleotide probe. J Vet Diagn Invest; 19: 282-285.

Weissenböck H, Ondrovics M, Gurtner S, Schiessl P, Mostegl MM und Richter B (2011): Development of a chromogenic in situ hybridization for *Giardia duodenalis* and its application in canine, feline, and porcine intestinal tissues samples. J Vet Diagn Invest; 23: 486-491.

West DM, Pomroy WE, Collett MG, Hill FI, Ridler AL, Kenyon PR, Morris ST und Pattison RS (2006): A possible role for *Neospora caninum* in ovine abortion in New Zealand. Small Rumin Res; 62: 135-138.

Wilking H, Thamm M, Stark K, Aebischer T und Seeber F (2016): Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. Sci Rep; 6: 22551.

Williams RH, Morley EK, Hughes JM, Duncanson P, Terry RS, Smith JE und Hide G (2005): High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitology*; 130: 301-307.

Wolf A, Cowen D und Paige B (1939): Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. *Science*; 89: 226-227.

Xie YX, Herget T, Hallmayer J, Starzinski-Powitz A und Hossmann KA (1989): Determination of RNA content in postischemic gerbil brain by in situ hybridization. *Metab Brain Dis*; 4: 239-251.





**IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Taxonomische Einordnung von <i>Toxoplasma</i> .....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines <i>T. gondii</i> Tachyzoiten.....	6
Abbildung 3: Entwicklungszyklus von <i>T. gondii</i> .....	9
Abbildung 4: Karte von Bayern.....	54



**X. TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Übersicht von Studien zum Vorkommen von <i>T. gondii</i> bei Schafaborten .....	13
Tabelle 2: Übersicht von Studien zum Vorkommen von <i>N. caninum</i> bei natürlich aufgetretenen Schafaborten .....	25
Tabelle 3: Herkunft und Verteilung der untersuchten Schafaborte (n = 200) und Schafbestände (n = 107) .....	53
Tabelle 4: Weitere Angaben und Untersuchungsergebnisse zu den <i>T. gondii</i> -assozierten Schafaborten .....	55
Tabelle 5: Weitere Angaben und Untersuchungsergebnisse zu den <i>N. caninum</i> -assozierten Schafaborten .....	56
Tabelle A1: Automatisiertes H&E-Färbeprotokoll .....	114
Tabelle A2: IHC-Protokoll .....	115
Tabelle A3: ISH-Protokoll .....	116
Tabelle A4: Entparaffinierungs- und Extraktionsprotokoll für die real-time PCR .....	117
Tabelle A5: Temperaturprofil <i>T. gondii</i> real-time PCR .....	118
Tabelle A6: Temperaturprofil <i>N. caninum</i> real-time PCR .....	118



## **XI. ANHANG**

### **1. Methoden**

#### **1.1. Herstellung von Gewebeschnitten**

Von den archivierten Paraffinblöcken wurden mit einem Rotationsmikrotom (RM2255; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) ca. 2 (H&E) bzw. 3 µm (IHC, ISH) dicke Schnitte hergestellt, die in einem Wasserbad bei 45 °C gestreckt und auf Glasobjektträger (IHC, ISH: SuperFrost Plus) aufgezogen wurden. Vor der Färbung wurden die Schnitte in einem Trockenschrank (TDO 66, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) für 20–30 Minuten bei 60–65 °C getrocknet. Schnitte für die IHC bzw. ISH wurden vor der Trocknung im Trockenschrank über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

## 1.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die H&E-Färbung erfolgte in einem Färbeautomaten (Varistain 24-4, Fa. Shandon, Frankfurt, Deutschland) nach folgendem Protokoll:

**Tabelle A1: Automatisiertes H&E-Färbeprotokoll**

Reagenz	Dauer	Entparaffinierung
2 x Xylol	2 min	
1 x Xylol	5 min	
2 x 2-Propanol	2 min	
1 x Ethanol 96 %	2 min	
1 x Ethanol 96 %	1 min	
1 x Ethanol 70 %	1 min	
1 x Aqua dest.	2 min	
1 x Häkalaunlösung nach Mayer	8 min	
1 x Aqua dest.	10 sec	
1 x Salzsäure 0,1 %	5 sec	
2 x Leitungswasser, fließend	5 min	
1 x Aqua dest.	10 sec	
1 x Eosin 0,25 %	10 sec	
1 x Aqua dest.	30 sec	
2 x Ethanol 96 %	30 sec	
1 x 2-Propanol	1 min	
1 x 2-Propanol	1,5 min	
2 x Xylol	1 min	
1 x Xylol	2 min	

Anschließend wurden die H&E-Schnitte in einem Eindeckautomaten (Promounter RCM 60, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) mit einem xylolhaltigen Eindeckmittel (Pertex, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) eingedeckt.

### 1.3. Immunhistochemie

Zunächst wurden die Gewebeschnitte automatisch entparaffiniert (vgl. XI.1.2. Protokoll H&E-Färbung, Tabelle A1). Anschließend wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll immunhistochemisch angefertigt:

**Tabelle A2: IHC-Protokoll**

Protokollschritt	Dauer
1 x Aqua dest.	
1 x IHC-Waschpuffer	2 min
Inkubation <sup>1</sup> mit Protease XXIV	10 min
2 x IHC-Waschpuffer	1 min
Inkubation <sup>1</sup> mit Universalblock	8 min
2 x IHC-Waschpuffer	1 min
Inkubation <sup>1</sup> mit Kaninchen-Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> -Antikörper (1:1000); Negativkontrollen mit Kaninchen-Normalserum	über Nacht
2 x IHC-Waschpuffer	1 min
Inkubation <sup>1</sup> mit DCS Polymer-Enhancer <sup>2</sup>	17 min
2 x IHC-Waschpuffer	1 min
Inkubation <sup>1</sup> mit DCS Polymer-Reagenz <sup>2</sup>	30 min
2 x IHC-Waschpuffer	1 min
Inkubation mit PermaRot <sup>2</sup> (1:100)	6 min
1 x Aqua dest.	2 min
Kernfärbung mit Hämalaunlösung nach Mayer	5 min
Bläuen in warmem Leitungswasser	5 min
1 x Aqua dest.	
1 x Ethanol 96%, 2 x 2-Propanol, 2 x Xylol	kurz eintauchen

<sup>1</sup> Inkubation fand bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer statt.

<sup>2</sup> Reagenzien im SuperVision RED 2 AP Kit (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland) enthalten.

Anschließend wurden die IHC-Schnitte in einem Eindeckautomaten (Promounter RCM 60, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) mit einem xylolhaltigen Eindeckmittel (Pertex, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) eingedeckt.

#### 1.4. In-situ-Hybridisierung

Die Schnitte wurden nach folgendem In-situ-Hybridisierungs-Protokoll angefertigt:

**Tabelle A3: ISH-Protokoll**

Protokollschritt	Dauer
Entparaffinierung der Schnitte (2 x Xylol, 2 x Ethanol 100 %, 1 x Ethanol 96 %, 1 x Ethanol 70%, 1 x Aqua dest.)	je 5 min
Inkubation <sup>1</sup> mit Protease XXIV	10 min
2 x Aqua dest.	kurz eintauchen
1 x Ethanol 96 %	kurz eintauchen
1 x Ethanol 100% (PCR)	5 min
Schnitte lufttrocknen	
Hybridisierungslösung auf Schnitte geben, abdecken mit Deckgläschen	
Hybridisierung der Schnitte in einer Metallschale im Wasserbad bei 95 °C	6 min
Inkubation in feuchter Kammer im Brutschrank bei 40 °C	über Nacht
Deckgläschen entfernen	
Waschen in 2x SSC	10 min
Waschen in 1x SSC	10 min
Waschen in 0,1x SSC	10 min
Inkubation <sup>1</sup> mit Äquilibrationpuffer	30 min
Inkubation <sup>1</sup> mit anti-Digoxigenin-AP-Fab-Fragment (1:100 in Äquilibrationpuffer)	60 min
2 x waschen in Puffer I (1x)	15 min
1 x waschen in Puffer III	
Inkubation <sup>1</sup> mit Farbreagenz (im Dunkeln)	ca. 60 min
1 x waschen in TE-Puffer (pH 8.0)	10 min
1 x Aqua dest.	
Kernfärbung mit Hämalaunlösung nach Mayer	10 sec
Bläuen in warmem Leitungswasser	3 min
1 x Aqua dest.	

<sup>1</sup> Inkubation fand bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer statt.

Anschließend wurden die ISH-Schnitte per Hand mit einem wässrigen Eindeckmittel (Aquatex, Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.



## 1.5. Real-time PCR

### Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Von den FFPE-Blöcken der Eihaut jedes Falles wurden mit einem Rotationsmikrotom (RM2255; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) 4–8 x 5 µm dicke Röllchen geschnitten und in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Anschließend wurden diese Gewebeproben nach folgendem Protokoll entparaffiniert und die DNA daraus extrahiert:

**Tabelle A4: Entparaffinierungs- und Extraktionsprotokoll für die real-time PCR<sup>1</sup>**

Protokollschritt	Dauer
1200 µl Xylol zugeben, mischen	
Zentrifugieren (13000 rpm)	5 min
Überstand abpipettieren	
1200 µl Ethanol (PCR) zugeben, mischen	
Zentrifugieren (13000 rpm)	5 min
Überstand abpipettieren	
1200 µl Ethanol (PCR) absolut zugeben, mischen	
Zentrifugieren (13000 rpm)	5 min
Überstand abpipettieren	
Reaktionsgefäß bei 37 °C offen inkubieren	10–15 min
180 µl ATL-Puffer <sup>2</sup> + 20 µl Proteinase K <sup>2</sup> zugeben	
Probenlyse bei 56 °C	ca. 2 h
Zentrifugieren (13000 rpm)	3 min
200 µl AL-Puffer <sup>2</sup> + 200 µl Ethanol (PCR) zugeben, mischen	
Übertrag des Gemisches auf Extraktionssäule (Spin-Säule)	
Zentrifugieren (8000 rpm)	1 min
500 µl AW1 <sup>2</sup> auf Spin-Säule geben	
Zentrifugieren (8000 rpm)	1 min
500 µl AW2 <sup>2</sup> auf Spin-Säule geben	
Zentrifugieren (13000 rpm)	3 min
trocken Zentrifugieren	1 min
Spin-Säule auf Reaktionsgefäß setzen + 100 µl AE-Puffer <sup>2</sup> zugeben	
Zentrifugieren (8000 rpm)	1 min
Eluat in Reaktionsgefäß fest verschließen und bei -80 °C aufbewahren	

<sup>1</sup>Protokoll basierend auf Anleitung des Herstellers (DNeasy Blood & Tissue Handbook)

<sup>2</sup>Reagenzien im DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) enthalten.

### **Nachweis von *T. gondii***

Pro Reaktionsansatz wurden je 5 µl extrahierte DNA (Eluat) zu 8 µl Mastermix (ID Gene *Toxoplasma gondii* Duplex, IDvet, Frankreich) gegeben. Die PCR-Amplifikation fand in einem LightCycler 96 (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) unter folgenden Bedingungen statt:

**Tabelle A5: Temperaturprofil *T. gondii* real-time PCR**

Aktivierung der Polymerase	10 min	95 °C	1x
DNA-Denaturierung	15 sec	95 °C	40 x
Annealing und Elongation	60 sec	60 °C	

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der LightCycler® 96 Software (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) ausgewertet.

### **Nachweis von *N. caninum***

Pro Reaktionsansatz wurden je 5 µl extrahierte DNA (Eluat) zu 20 µl Mastermix (*N. caninum*; vgl. XI.2.2.) gegeben. Die PCR-Amplifikation fand in einem LightCycler 96 (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) unter folgenden Bedingungen statt:

**Tabelle A6: Temperaturprofil *N. caninum* real-time PCR**

Aktivierung der Polymerase	15 min	95 °C	1x
DNA-Denaturierung	15 sec	94 °C	45 x
Annealing und Elongation	60 sec	60 °C	

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der LightCycler® 96 Software (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) ausgewertet.

## 2. Materialien

### 2.1. Verwendete Chemikalien

#### 2.1.1. Chemikalien

20x SSC Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
2-Propanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Antikörper-Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik- Systeme, Hamburg, Deutschland
Aquatex® (wässriges Eindeckmittel)	Merck, Darmstadt, Deutschland
BCIP	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland
Denhardt's Lösung (50x)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DEPC	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dextransulfat 500 Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin G (C.I. 45380)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100%	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Ethanol 96 %, vergällt	Chemsolute, Renningen, Deutschland
Ethanol (ROTIPURAN $\geq 99,8\%$ , p.a.) (für PCR)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formamid deionisiert für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Goat serum (Ziegen-Normalserum)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hämalaunlösung sauer nach Mayer für die Mikroskopie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Heringsperma DNA-Lösung (Stammlösung)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IHC-Waschpuffer (20x)	DCS Innovative Diagnostik- Systeme, Hamburg, Deutschland

Levamisol-Hydrochlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrat $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl (5 M)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Natriumchlorid $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NBT	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Pertex® (xylolhaltiges Eindeckmittel)	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Protease XXIV	BioGenex, Fremont, CA, USA
Rabbit Negative Control (Kaninchen-Normalserum)	BioGenex, Fremont, CA, USA
Salzsäure 25 %, p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TE-Puffer (1x) pH 8,0	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TRIS Hydrochlorid $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl pH 7,5 (1M)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Triton® X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Universalblock, gebrauchsfertig	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland
Wasser (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol, Isomerengemisch	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.2. Kits

DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
ID Gene™ <i>Toxoplasma gondii</i> Duplex (real-time PCR kit)	IDvet, Grabels, Frankreich
QuantiTect® Probe PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperVision RED 2 AP Kit (Maus/Kaninchen) 2-Schritt-Polymer-Kit, Alkalische Phosphatase-konjugiert, mit Chromogen	DCS Innovative Diagnostik- Systeme, Hamburg, Deutschland

### 2.1.3. Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments from sheep	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> Rabbit Polyclonal Antibody (PU125-UPE)	BioGenex, Fremont, CA, USA

### 2.1.4. Oligonucleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide (Sonden und Primer) wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Die Sequenzen (5' → 3') lauteten wie folgt:

#### Oligonucleotid-Sonden für die ISH (*Toxoplasma gondii*)

TOX-3 (18S rRNA):	CCA CAC AAT GAA GTG TGG AGA AAT CCA GAA GG- [DIG]
TOX-4 (28S rRNA):	ACA AGT CAA CAG CTC GGA AAG AGC AGT TG-[DIG]

#### Primer und Sonden für die real-time PCR

##### *N. caninum*:

Neo-Gro-F:	GTG CTC GCT GGG ACT TCA G
Neo-Gro-R:	CGA TTT ACG ACA TAC GGT GTT CA
Neo-Gro-S:	[FAM]-CAT CGG AGG ACA TCG CTC ACT GAC TG- [TAMRA]

##### Interne Kontrolle (IC):

ACT2-1030-F:	AGC GCA AGT ACT CCG TGT G
ACT-1135-R:	CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T
ACT-1081-HEX:	[HEX]-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-[BHQ1]

## 2.2. Verwendete Puffer und Lösungen

### H&E-Färbung

#### **Ethanol 70 %**

730 ml Ethanol 96 %  
270 ml Aqua dest.

#### **Salzsäure 1 %**

40 ml Salzsäure 25 %  
960 ml Aqua dest.

#### **Salzsäure 0,1 %**

10 ml Salzsäure 1 %  
90 ml Aqua dest.

#### **Eosin 0,25 %**

2,5 g Eosin G  
500 ml 2-Propanol  
500 ml Aqua dest.  
0,2 ml Essigsäure 99 %

### Immunhistochemie

#### **IHC-Waschpuffer**

50 ml Waschpuffer (20×)  
950 ml Aqua dest.

### In-situ-Hybridisierung

#### **DEPC-Wasser ( $\triangleq$ Aqua dest. bei ISH)**

1 ml DEPC  
1000 ml Aqua bidest.

#### **Ethanol 70% (ISH)**

700 ml Ethanol 100%  
300 ml Aqua dest.

#### **Ethanol 96% (ISH)**

960 ml Ethanol 100%  
40 ml Aqua dest.

#### **Hybridisierungslösung (ISH)**

500 µl Formamid  
200 µl 20x SSC  
110 µl Aqua dest.  
100 µl Dextransulfat 50%  
50 µl Heringssperma-DNA  
20 µl Denhardt's Lösung (50x)  
10 µl ISH-Sonde TOX-3 (1 µg/µl)  
10 µl ISH-Sonde TOX-4 (1 µg/µl)

#### **Heringssperma-DNA**

##### **(Gebrauchslösung 50 µg/ml)**

5 µl Stammlösung (10 mg/ml)  
995 µl TE-Puffer (1x)

#### **Dextransulfat 50%**

10 g Dextransulfat  
ad 20 ml Aqua dest.

#### **2x SSC**

100 µl 20x SSC  
900 µl Aqua dest.

#### **1x SSC**

50 µl 20x SSC  
950 µl Aqua dest.

#### **0,1x SSC**

100 µl 1x SSC  
900 µl Aqua dest.

### **Äquilibrierungspuffer (ISH)**

500 µl Puffer I (2x)  
500 µl Aqua dest.  
50 µl Normalserum (Ziege)  
30 µl Triton X 10%

### **Triton X 10 %**

9 ml Aqua dest.  
1 ml Triton X 100

### **Puffer I (2x)**

200 ml Tris-HCl (1M) (pH 7,5)  
60 ml NaCl (5M)  
ad 1000 ml Aqua dest.

### **Puffer III (pH 9,5)**

15,80 g Tris-HCl  
5,80 g NaCl  
4,75 g MgCl<sub>2</sub>  
ad 1000 ml Aqua dest.

### **Farbreagenz (ISH)**

1000 µl Puffer III  
4,5 µl NBT  
3,5 µl BCIP  
2,5 µl Levamisol

### **Levamisol**

96 mg Levamisol-Hydrochlorid  
1 ml Aqua dest.

## **Real-time PCR**

### **Mastermix (*N. caninum*):**

12,5 µl QuantiTect Probe PCR Master Mix  
6,5 µl RNase-freies Wasser  
0,2 µl Primer Neo-Gro-F (100 pmol/µl)  
0,2 µl Primer Neo-Gro-R (100 pmol/µl)  
0,25 µl Sonde Neo-Gro-S (10 pmol/µl)  
0,25 µl Sonde ACT-1081-HEX (100 pmol/µl)  
0,05 µl Primer ACT2-1030-F (100 pmol/µl)  
0,05 µl Primer ACT-1135-R (100 pmol/µl)

## **2.3. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Brutschrank (B 5050)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Combitips® advanced (0,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Deckgläser (24 x 32 mm; 24 x 50 mm)	Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG, Gudensberg, Deutschland
Eindeckautomat (RCM 60)	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Farbmikroskopkamera (DFC 450)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Färbeautomat (Varistain 24-4)	Shandon GmbH, Frankfurt, Deutschland
Färbekammern (StainTray™ mit Deckel)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Färbeküvetten nach Hellendahl, erweitert	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Filterspitzen (Biosphere® Filter Tips) (0,5–20 µl; 2–100 µl; 100–1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Heizplatte (für Gewebeschnitte)	Kunz Instruments, Kopenhagen, Dänemark
Kolbenhubpipette (Eppendorf Reference®) (0,5–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlplatte (MPS/C)	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Lichtmikroskop (DM 2500)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrotomklinge (A35)	pfm medical ag, Köln, Deutschland
Multipette® E3	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Objektträger (SuperFrost® Plus; Matrand, geschliffen)	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
PCR-Platten und Folie (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96)	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland
Präzisionswaage (BP 150, BP 6100)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Real-time PCR-Cycler (LightCycler® 96 Instrument)	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland
Reaktionsgefäß (Safe-Lock Tubes) (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5ml (DNA LowBind)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Thermomixer (comfort 5355)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Trockenschrank (TDO 66)	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Vortex-Schüttler (REAX 2000)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad (für Gewebeschnitte)	Kunz Instruments, Kopenhagen, Dänemark
Wasserbad (für ISH)	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge (5810)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (10 ml; 50 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland



## 2.4. Verwendete Software

Text, Tabellen, z. T. Abbildungen	Microsoft Office 2016 (Microsoft Corp., Redmond, USA)
Auswertung real-time PCR	LightCycler® 96 Software (Version 1.1; Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland)
Histologische Abbildungen	Leica Application Suite (Version 4.13.0; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland);  Adobe Photoshop 2020 (Adobe Inc., San José, USA)
Statistische Auswertung	R Statistik (Version 3.5.1; <a href="https://www.r-project.org">https://www.r-project.org</a> )
ISH-Sonden-Design	NCBI GenBank ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a> );  BLAST ( <a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> )

### 3. Alignment der zu den *T. gondii*-ISH-Sonden komplementären rRNA-Gensequenzen nahe verwandter zystenbildender Kokzidien

Referenzsequenzen:

Erreger	GenBank-Eintragungsnummer:	
	18S rRNA	28S rRNA
<i>Hammondia heydorni</i>	KT184370	AF159240
<i>Hammondia hammondi</i>	KT184369	AF101077
<i>Toxoplasma gondii</i>	L24381	AF076901
<i>Neospora caninum</i>	L24380	AF001946
<i>Besnoitia besnoiti</i>	AF109678	AF076900

Nukleotide mit **gelbem Rahmen**: Sequenz, komplementär zur *T. gondii*-ISH-Sonde

Nukleotide mit **schwarzem Rahmen**: nicht übereinstimmende Nukleotide/Basenpaare (Mismatch)

Alignment der entsprechenden 18S rRNA-Gensequenzen:

```

H.heydorni      CCTTCTGG-ATTTCTT[CACACTTCATTGTGTGG
H.hammondi      CCTTCTGG-ATTTCTCCACACTTCATTGTGTGG
T.gondii        CCTTCTGG-ATTTCTCCACACTTCATTGTGTGG
N.caninum       CCTTCTGG-ATTTCTT[CACACTTCATTGTGTGG
B.besnoiti      CCTTCTGGT[AGCGCTT[CACACTTCATTGTGTGG
***** *      ** *****
  
```

Alignment der entsprechenden 28S rRNA-Gensequenzen:

```

H.heydorni      CAACTGCTCTTTACTGAGCTGTTGACTTGT
H.hammondi      CAGCTGCTCTTT-CCGAGCTGTTGACTTGT
T.gondii        CAACTGCTCTTT-CCGAGCTGTTGACTTGT
N.caninum       CAACTGCTCTTCACTGAGCTGTTGACTTGT
B.besnoiti      CGACGGCTCTTG--TGAGCTTTCGACTTGT
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
  
```

## **XII. DANKSAGUNG**

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Kaspar Matiassek für die Möglichkeit, meine Dissertation unter seiner Leitung anzufertigen, und für seine freundliche und fachlich kompetente Unterstützung bedanken.

Ein großes Dankeschön an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Erlangen für die Bereitstellung der Räumlichkeiten, Gerätschaften und Arbeitsmaterialien; in diesem Zusammenhang auch vielen Dank an Herrn Dr. Reiner Faul und Herrn Dr. Dr. Frank Just für ihre Zustimmung zur Erstellung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Matthias Müller bedanken, der mir diese Arbeit in dieser Form ermöglicht hat sowie für die Auswahl des interessanten und methodisch sehr abwechslungsreichen Themas. Vielen Dank für deine fachliche Kompetenz, die vielen konstruktiven Gespräche und Diskussionen, deine stets ermutigenden Worte und für die kritische und zügige Durchsicht meiner Manuskripte.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeiter:innen des Sachbereichs Pathologie Nord am LGL Erlangen für die Unterstützung meiner Arbeit, die freundliche Atmosphäre und herzliche Aufnahme in eurer Mitte bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht dabei an Frau Dana Schleinitz und Herrn Helmut Puchta. Ohne eure unermüdliche und freundliche Unterstützung, Motivation, Einarbeitung und konstruktive Beratung rund um das Thema „Histologie“ wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Darüber hinaus ein riesengroßes Dankeschön an das „Team Histo“ für die vielen schönen gemeinsamen Stunden, die ich mit euch sowohl im, als auch außerhalb des Labors verbringen durfte!

Ein großer Dank geht außerdem an das Team des Sachbereichs Virologie Nord am LGL Erlangen für die fortwährende Unterstützung meiner Arbeit; allen voran an Frau Dr. Nelly Scuda für die fachkundige Beratung und die gewissenhafte Durchsicht meiner Entwürfe sowie die stets aufmunternden Worte. Ein herzliches Dankeschön gebührt außerdem den Mitarbeiter:innen des PCR-Labors, insbesondere Herrn Thomas Neuß für die ausführliche Einarbeitung sowie für die unentwegte Hilfsbereitschaft bei molekularbiologischen und labortechnischen Fragen.

Ein ganz besonders großes Dankeschön auch an Frau Dr. Marie Franziska Sommer für die tatkräftige, fachliche und moralische Unterstützung, die kritische Korrektur meines Paper-Manuskripts und für dein jederzeit offenes Ohr in allen Lebenslagen.

Deine Geduld und dein unermüdliches Engagement waren eine riesengroße Hilfe beim Erstellen dieser kumulativen Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. Monir Majzoub-Altweck und Frau Gudrun Goldmann vom Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät sowie an Frau Dr. Elisabeth Kemter vom Genzentrum der LMU München für ihre hervorragende Einarbeitung und Unterstützung bei der Etablierung der ISH-Methode.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. Martin Peters vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Westfalen in Arnsberg für die Zurverfügungstellung der in Paraffin eingebetteten Organe eines *T. gondii*-positiven Schafabortes zur Validierung der IHC-Methode danken.

Ein Dankeschön ebenfalls an Frau Dr. Jasmin Skuballa vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe für die zusätzliche Bestätigung der *T. gondii*-positiven Plazentaprobe.

Auch bei all meinen derzeitigen und ehemaligen Kolleg:innen, insbesondere jenen der Dachstelle Export, möchte ich mich bedanken, die stets für mich da waren, mich motiviert haben diese Arbeit voranzubringen und versucht haben, mir den Rücken so gut es ging freizuhalten.

Ein ganz besonderer Dank geht dabei an Herrn Dr. Hubert Diepolder. Lieber Hubert, vielen Dank für deine immerwährende fachliche, moralische und vor allem freundschaftliche Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während der gesamten Zeit unterstützt, motiviert und aufgemuntert haben. Meinem Bruder gilt dabei besonderer Dank als Ansprechpartner für alle Fragen rund um das Thema EDV und die Formatierung dieser Arbeit.

Mein größter und grenzenloser Dank gilt aber meinen Eltern. Dafür, dass ihr immer an mich glaubt und mich immer unterstützt, egal in welche Richtung mein Weg auch geht. Dafür, dass ihr mir mein Studium und diese Arbeit ermöglicht habt und für euren bedingungslosen Rückhalt. Euer Vorbild und eure Liebe haben mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin und darauf bin ich sehr stolz!

DANKE